
ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ÉPURATION DES EAUX RÉSIDUAIRES DES VILLES ET DES INDUSTRIES

PAR LE D^r A. CALMETTE

Directeur de l'Institut Pasteur de Lille.

L'un des plus graves problèmes dont la solution s'impose aux villes et aux grandes industries est celui de l'*épuration des eaux résiduaires*.

Par ce terme *épuration*, il faut entendre la destruction complète des matières organiques putrescibles et la *minéralisation* de celles-ci, c'est-à-dire leur désintégration en éléments minéraux simples.

On a longtemps confondu et on confond encore souvent l'*épuration* avec la *clarification*. Or, la clarification des eaux résiduaires se borne à réaliser la séparation mécanique, ou la précipitation par des réactifs chimiques des particules flottantes non dissoutes ou coagulables. Elle ne réalise pas une véritable *épuration*, car elle laisse intactes toutes les substances organiques dissoutes telles que les peptones, les amides, l'ammoniaque. L'eau qui renferme une proportion plus ou moins considérable de ces substances est putrescible; elle reste mal odorante; elle pollue les cours d'eau et elle est nuisible à la vie des poissons ou des plantes. On ne peut donc pas la considérer comme *épurée*.

Toutes les fois qu'on traite des eaux résiduaires industrielles par la simple décantation ou par des réactifs divers, chaux, sulfate d'alumine, sulfate ferreux ou sulfate ferrique, chlorures

ou hypochlorites alcalins, on fait de la *précipitation*, on débarasse l'eau des matières albuminoïdes coagulables et des corps flottants, mais l'épuration reste incomplète.

Les seuls agents capables d'effectuer la désintégration et la minéralisation des molécules organiques sont les *microbes* ou la combustion directe par le feu.

Ce sont les microbes qui désagrègent et décomposent les cadavres d'animaux et de végétaux, et les fumiers que l'on enfouit dans la terre ou qui s'accumulent à la surface de celle-ci.

Ce sont eux encore qui réalisent l'épuration spontanée des rivières ou des fleuves auxquels l'homme confie le soin d'éloigner de lui les déchets de la vie.

Et c'est grâce à eux enfin que, dans le procédé de l'*épandage*, le sol cultivé transforme les souillures de toutes sortes qu'on déverse à sa surface en éléments gazeux qui s'échappent dans l'atmosphère sous forme de vapeur d'eau, d'azote libre ou d'acide carbonique, et en nitrates de soude, de potasse ou de chaux qui servent d'aliments aux plantes.

Il était donc tout indiqué qu'à partir du moment où ce rôle des microbes nous fut révélé par la science, on cherchât à adapter ceux-ci plus directement à nos besoins de destruction rapide des résidus de nos agglomérations et de nos industries.

Et c'est ainsi qu'on a été amené à la découverte des procédés récents d'épuration biologique, sur lesquels l'attention des ingénieurs sanitaires et des hygiénistes du monde civilisé est aujourd'hui concentrée.

Je dois me borner à indiquer ici les principes sur lesquels s'appuient les principaux d'entre eux, et j'exposerai brièvement le plan des recherches nouvelles que j'ai pu entreprendre à leur sujet à l'Institut Pasteur de Lille et dans l'installation expérimentale de La Madeleine, grâce aux libéralités de la Caisse nationale des recherches scientifiques.

*
* *
*

L'*épuration biologique* des eaux résiduaires peut être réalisée par diverses méthodes basées sur le travail exclusif des microbes, ou par des systèmes mixtes qui utilisent certains réactifs chimiques avec des actions microbiennes consécutives.

Lorsqu'on s'adresse aux microbes seuls, il faut que ceux-ci désagrègent et dissolvent d'abord les corps organiques en suspension dans l'eau, et qu'ils oxydent ensuite les molécules organiques dissoutes, pour les minéraliser.

Dans le second cas, si l'on fait précéder les actions microbiennes de l'emploi d'un réactif chimique capable de précipiter les matières en suspension et les albuminoïdes coagulables, le rôle des microbes se réduit à un travail d'oxydation et de minéralisation des molécules organiques dissoutes.

La détermination des matières entraînées par les eaux nous montrera tout de suite quels peuvent être les avantages et les inconvénients respectifs de ces deux systèmes.

*
* *

Les eaux d'égout des villes et les eaux résiduaires industrielles contiennent, en proportions très variables, deux sortes de substances :

1^o Des substances *ternaires*, composées surtout de carbone, d'oxygène et d'hydrogène, et dont les plus importantes sont les résidus cellulosiques de papier ou de végétaux, l'amidon, les dextrines et les sucres, les alcools, les acides organiques (lactique, malique, succinique, etc.), les matières colorantes et les graisses;

2^o Des substances *quaternaires* composées elles aussi de carbone, d'oxygène et d'hydrogène, et en plus d'azote, avec des proportions plus ou moins considérables d'autres corps minéraux simples tels que le soufre, le phosphore, l'arsenic, le fer, le manganèse, les métaux alcalins ou alcalino-terreux, etc. On les trouve dans les résidus animaux et dans une foule de détritux végétaux. Les principales sont la fibrine, les albumines, caséines, la lécithine, l'urée, le gluten, etc.

La désintégration moléculaire des substances ternaires s'effectue surtout par des microbes *anaérobies* ou par des espèces microbiennes capables de vivre en anaérobies facultatifs, c'est-à-dire à l'abri de l'oxygène de l'air. Ces microbes empruntent alors l'oxygène dont ils ont besoin comme tous les êtres vivants aux substances mêmes qu'ils décomposent et cette décomposition aboutit à la formation d'hydrogène libre ou

d'hydrogène carboné (CH_4 ou gaz des marais) et d'acide carbonique.

Les substances quaternaires, abondantes surtout dans les eaux d'égout des villes ou de certaines industries (abattoirs, laiteries, tanneries), peuvent être désintégrées par une multitude d'espèces microbiennes *anaérobies*, *anaérobies facultatives* ou *aérobies*. Leur désintégration s'opère par une série d'étapes successives qui aboutit à la formation de peptones, de composés ammoniacaux et d'ammoniaque libre, puis de nitrites et de nitrates alcalins, avec élimination d'une proportion plus ou moins grande d'azote, d'hydrogène libre ou carboné et d'acide carbonique.

Suivant que l'un ou l'autre de ces deux ordres de substances prédominera, il sera plus avantageux, au point de vue économique, de confier aux actions microbiennes le soin de détruire la totalité des matières contenues dans les eaux à épurer, ou de séparer d'abord, par une précipitation mécanique ou chimique celles de ces matières qui peuvent être vendues avec profit comme engrais.

On ne doit pas se dissimuler cependant que la récupération des résidus, même riches en azote, des eaux d'égout, est une opération rarement rémunératrice. Au début d'une exploitation de quelque importance on parvient presque toujours à écouler ces résidus au voisinage des grandes villes. La culture les achète volontiers. Mais bientôt, celle-ci n'en ayant plus l'utilisation immédiate, on est obligé de les céder à vil prix, puis de payer pour s'en débarrasser, parce qu'on ne peut les laisser s'accumuler et qu'il devient indispensable de les évacuer au loin. Les frais de transport deviennent alors plus élevés que leur valeur propre.

Toutes les villes qui ont essayé l'application en grand des systèmes d'épuration chimique ont éprouvé ces vicissitudes et ces déboires. On ne saurait en être surpris si l'on veut bien réfléchir à ce fait que partout, à l'heure actuelle, l'usage des engrais chimiques s'est largement répandu, et qu'il est facile aux cultivateurs éclairés de se procurer des engrais riches dont 100 kilogrammes renferment une valeur de 10 à 12 francs d'azote par exemple. Pourquoi ces mêmes cultivateurs s'aviseraient-ils alors de transporter à grands frais 2 ou 3,000 kilo-

grammes de boues sèches, valant ensemble 10 ou 12 francs d'après leur teneur en azote, c'est-à-dire exactement ce qu'ils peuvent trouver dans 100 kilogrammes d'un engrais chimique de composition plus constante et répondant plus exactement à leurs besoins?

Outre cet inconvénient si grave de l'encombrement des boues, les procédés chimiques en présentent d'autres également redoutables : ils obligent à des dépenses continuelles pour l'achat de réactifs, et pour que ceux-ci agissent efficacement, il est indispensable de varier à chaque instant leurs proportions dans l'eau à traiter, suivant les changements incessants de composition que présente celle-ci. Dans les villes aussi bien que dans les industries, les eaux résiduaires subissent de larges oscillations dans leur volume, dans leur aspect et dans la nature des résidus qu'elles reçoivent. Il est facile de comprendre que les quantités de réactifs à mélanger doivent osciller parallèlement, si l'on veut que la précipitation s'effectue d'une manière satisfaisante. Et c'est là, peut-être, la difficulté la plus difficile à vaincre!

Toutes ces considérations nous incitent à chercher plutôt la solution du problème du côté des systèmes d'épuration exclusivement biologiques. Ceux-ci, du moins, visent à la suppression des boues et à la suppression des réactifs, en même temps qu'ils réalisent une épuration vraie par la désintégration totale des matières organiques et non plus seulement la précipitation des matières en suspension ou des substances albuminoïdes coagulables.

*
* *

Épuration par le sol. Épandage.

Le prototype de ces systèmes biologiques est représenté par l'épandage, avec ou sans utilisation agricole. Le sol est, sans conteste, le meilleur agent d'épuration, parce qu'il constitue l'habitat normal des innombrables espèces microbiennes auxquelles la nature a confié le soin de décomposer toutes les substances organiques végétales ou animales, résidus ou déchets des êtres vivants.

Mais, pour qu'il soit efficace, deux conditions essentielles

s'imposent : le sol choisi doit être *très absorbant et perméable à l'air*.

L'épandage n'est donc possible que sur les sols poreux, profonds et très bien drainés.

Dans le nord de la France, les sols de porosité moyenne sont capables d'épurer environ 110 mètres cubes d'eau d'égout par jour et par hectare sur 1 mètre de profondeur. Or ce chiffre, qui correspond à 40,000 mètres cubes par hectare et par an, est celui qui a été adopté par la ville de Paris pour les champs d'épandage d'Achères.

Il ne peut être que rarement dépassé.

A ce taux, une ville de 100,000 habitants, produisant, avec le tout à l'égout, à raison de 100 litres par habitant et par jour, 10,000 mètres cubes d'eaux résiduaires ou 3,650,000 mètres cubes par an, nécessiterait une surface d'épandage égale à 91 hectares.

En supposant qu'une telle surface, uniformément perméable, fût disponible à son voisinage, elle serait le plus souvent d'un prix trop élevé.

Et si l'on tient compte de la difficulté extrême que rencontrent les villes à se procurer à bon compte des terrains peu éloignés et convenables pour l'épandage, on comprend que ce système d'épuration n'ait pu être adopté que par de grandes capitales comme Paris, Berlin, ou par quelques villes comme Reims, qui avaient à leurs portes de vastes terrains sablonneux ou calcaires très absorbants et presque sans valeur.

Les cités industrielles du nord de la France, Lille, Roubaix, Tourcoing, pour ne citer que les plus importantes, ne songeront jamais à s'adresser à lui pour épurer leurs eaux d'égout. Outre que le sol arable y possède une valeur énorme (10,000 francs l'hectare), sa perméabilité est très faible à cause de la couche épaisse d'argile qui recouvre les assises calcaires sur presque toute la région.

Il est incontestable, d'autre part, que l'épandage présente, au point de vue de l'hygiène, des inconvénients graves qui ne permettent plus d'en conseiller l'emploi lorsqu'on peut l'éviter; l'exemple de Gennevilliers et d'Achères, et surtout celui de Carrières-Triel, montrent que les nappes souterraines qui alimentent les puits des villages voisins se contaminent trop facile-

ment par les infiltrations profondes du sol, et que la grande culture sur laquelle on avait fondé tant d'espérances, souffre très souvent d'être obligée d'absorber de trop grandes quantités d'eau d'égout.

C'était d'ailleurs une erreur de compter, comme on l'a fait au début, sur le rôle épurant de la culture. On supposait que les plantes agissaient de deux manières en se développant : on pensait que la pénétration de leurs racines rendait le sol plus perméable, ce qui est exact ; mais on croyait aussi qu'elles pouvaient utiliser pour leur nutrition une grande partie des matières organiques de l'eau d'égout. Or la science a montré, depuis les acquisitions récentes de la physiologie végétale et de la bactériologie, que les plantes ne peuvent assimiler les matières organiques qu'à l'état de nitrates solubles. Il faut, pour que ces matières organiques servent d'aliments aux plantes, qu'elles soient préalablement minéralisées ou transformées en nitrates solubles par les actions microbiennes dues aux ferments figurés du sol. Il y a donc tout avantage à réaliser cette transformation dans les eaux résiduaires avant d'utiliser celles-ci pour l'irrigation.

Enfin, il est aujourd'hui démontré que l'accumulation des matières organiques en train de se décomposer à la surface du sol arable favorise le développement et la multiplication d'insectes tels que les moustiques et les mouches, dont le rôle comme agents de transmission des maladies infectieuses apparaît de plus en plus important. Elle favorise aussi le développement, sur les végétaux, de toutes sortes de vers et de parasites intestinaux (trichocéphales, ascaris, oxyures), capables de produire des désordres souvent graves chez l'homme et chez les animaux domestiques nourris avec les légumes crus ou avec les fourrages que l'on cultive sur les champs d'irrigation.

Le seul moyen d'éviter ces inconvénients consiste à ne pratiquer l'épandage que sur les sols perméables, *non cultivés* ou seulement boisés, assez loin de toute agglomération et même de toute habitation pour que les nappes souterraines superficielles qui alimentent des forages et des puits ne puissent en éprouver aucune contamination.

Épuration biologique

Les acquisitions de la science relatives à la putréfaction et aux fonctions des microbes du sol arable comme agents de désintégration des matières organiques devaient forcément conduire les chimistes et les bactériologistes à l'essai de procédés d'épuration exclusivement *biologiques*. En précisant les conditions nécessaires à la vie des microbes capables, d'une part, de solubiliser les substances ternaires et quaternaires complexes que charrient les eaux d'égout, et, d'autre part, d'en disloquer les molécules pour les ramener à l'état d'éléments minéraux simples, on devrait théoriquement réaliser la destruction complète de tous les détritits humains, animaux et végétaux.

On pouvait donc concevoir un système idéal d'assainissement qui supprimerait les accumulations de boues encombrantes laissées par la précipitation chimique et qui permettrait de ne rendre au sol arable, aux rivières et aux fleuves, que des eaux parfaitement limpides et imputrescibles, immédiatement utilisables, s'il le fallait, pour les besoins alimentaires, agricoles ou industriels de l'homme.

Il ne semble plus douteux aujourd'hui que ce but soit bien près d'être atteint.

Les expériences poursuivies depuis 40 ans à la suite des importantes démonstrations de Dibdin, de sir Henry Roscoë, de Percy Frankland, de Gilbert Fowler en Angleterre, de Dunbar en Allemagne, de Hiram Mills et Kinnicut en Amérique, ont forcé l'attention des ingénieurs sanitaires de tous les pays.

Plus de 22 villes anglaises, au premier rang desquelles il convient de citer la grande ville industrielle de Manchester, n'emploient déjà plus que les procédés *biologiques ou bactériens* pour se débarrasser de leurs eaux d'égout et, malgré les tâtonnements inévitables dans l'application pratique de toute nouvelle découverte, les résultats obtenus sont déjà signalés partout comme très satisfaisants.

Le système bactérien appliqué aux eaux du tout à l'égout comprend 3 *phases* bien distinctes :

1^o La décantation et la séparation des résidus solides non

putrescibles (sable, gravier, scories, charbon, débris de fer, de pierres, etc.);

2° La dissolution des matières organiques par *fermentation anaérobie en fosse septique*;

3° La transformation des matières organiques dissoutes en nitrites et en nitrates par *oxydation sur lits bactériens aéro-bies*.

Dans la première phase, purement mécanique, les microbes ne jouent aucun rôle. Il s'agit seulement d'empêcher l'introduction, dans les fosses septiques, des corps étrangers minéraux, plus ou moins abondants dans toutes les eaux d'égout, qui ne sont pas susceptibles de se décomposer et qui entraîneraient bientôt une réduction importante de la capacité des fosses septiques.

La seconde phase est d'une importance capitale. Elle consiste à recevoir dans des bassins de 3 mètres de profondeur environ, qui doivent rester constamment pleins, toutes les substances organiques putrescibles qui restent en suspension dans l'eau : les débris de papier, de végétaux divers, les détritus ménagers de toutes sortes (viandes, graisses), les résidus d'abattoirs ou de laiteries, les excréments humains et animaux, les déchets industriels.

La dimension des fosses septiques doit être calculée de telle manière que les eaux qui y pénètrent puissent y séjourner pendant environ 24 heures; c'est-à-dire qu'à chaque quantité d'eau admise à l'entrée, doit correspondre un volume égal à la sortie. Les fosses restent ainsi constamment pleines, et déjà quelques jours après leur mise en travail, il s'y établit une fermentation spontanée très active. Les microbes anaérobies s'y multiplient en formant un véritable levain et s'attaquent à toutes les molécules organiques solides en suspension, aussitôt que celles-ci arrivent à leur contact.

Lorsque ce levain est constitué, on trouve qu'il est capable de dissoudre, en 24 heures, un poids de matières organiques en suspension égal à celui que les eaux d'égout apportent dans le même temps. Il en résulte que, même après plusieurs années de fonctionnement, le volume des boues qui se déposent au fond des fosses n'augmente plus.

Au sortir des fosses septiques, l'effluent ne contenant plus que

des matières organiques dissoutes (à l'état de peptones, d'amides ou d'ammoniaque libre), doit être dirigé vers un canal collecteur qui permette déversement alternatif sur une série de lits bactériens d'oxydation, où l'épuration proprement dite s'effectuera : c'est la 3^{me} phase.

Celle-ci, dans le langage technique adopté, comporte 1, 2 ou 3 *contacts* successifs sur lits bactériens, c'est-à-dire que l'eau à épurer devra traverser successivement 1, 2 ou 3 bassins peu profonds, remplis de scories ou mâchefer, qui servent de supports aux microbes oxydants.

Ces bassins, dont la capacité utile est telle que chacun d'eux puisse être facilement rempli en 1 heure et vidé dans le même temps, sont construits en pente douce, à partir de la vanne d'entrée jusqu'à la vanne de sortie, et d'un drainage en forme d'arête de poisson, assurant l'écoulement facile de l'eau qui y est admise.

On y entasse, sur 1 mètre environ d'épaisseur, d'abord des grosses scories au-dessus des drains, puis des scories de 5 centimètres de diamètre environ, puis, à la surface, des scories fines criblées, de 1 centimètre à 5 millimètres de diamètre.

L'eau recueillie au sortir des fosses septiques dans le canal collecteur est déversée sur chaque lit au moyen d'un déversoir en éventail, et des rigoles rayonnantes assurent sa répartition régulière dans toute l'étendue du lit. Elle y séjourne pendant un temps variable qui n'excède jamais 2 heures. On la dirige ensuite sur un second lit bactérien exactement semblable au premier ; elle y reste encore pendant 2 heures. C'est le *second contact*.

Après ce second contact, l'épuration est ordinairement parfaite. Un troisième contact sur un troisième lit n'est nécessaire que lorsqu'il s'agit d'épurer certaines eaux résiduaires d'usines extrêmement chargées. Celles, très diluées, du tout à l'égout des villes sont, en général, suffisamment épurées après un seul contact.

J'ai indiqué tout à l'heure que les scories des lits bactériens servent de supports aux microbes oxydants. Ceux-ci sont apportés par les eaux d'égout elles-mêmes. Ils se multiplient dans les anfractuosités des scories et fixent la matière organique dissoute comme par une sorte de phénomène de teinture. Cette fixation ne s'effectue bien que lorsque les lits sont *mûrs*, c'est-à-dire

après 1 ou 2 mois de fonctionnement, lorsque les microbes aérobies sont assez nombreux.

A partir de ce moment, on règle les périodes alternatives d'immersion et d'aération des lits de la manière suivante :

1 heure pour remplir ;

2 heures de plein ;

1 heure pour vider ;

4 heures de vide, pour aérer les scories ;

soit 8 heures par période.

Chaque lit peut fonctionner suivant 3 périodes semblables par jour de 24 heures

Si leur capacité est calculée de manière à ce qu'à chaque période ils puissent recevoir en moyenne 333 litres d'eau d'égout par mètre cube ou par mètre carré de surface de lit ($\frac{1}{3}$ de la capacité volumétrique des lits, les deux autres tiers étant occupés par les scories), il en résulte qu'on peut déverser facilement sur chaque lit 1 mètre cube d'eau d'égout par mètre carré de surface et par jour.

Avec 2 contacts, on épurera donc, au total, 500 litres par mètre carré de surface et par jour, soit 5,000 mètres cubes par hectare et par jour, c'est-à-dire un volume d'eau d'égout au moins *45 fois plus considérable que par l'épandage* (5,000 mètres cubes par hectare et par jour au lieu de 110 mètres cubes si l'on adopte le taux réglementaire pour les champs d'épandage parisiens).

L'eau sortant du second lit bactérien, et souvent même du premier, doit être rendue imputrescible, d'une limpidité égale à celle des eaux de rivière, et inoffensive pour les plantes aquatiques et les poissons.

Lorsque les bassins de décantation séparent bien les matières lourdes imputrescibles (sable, gravier, charbon et scories), et lorsque la solubilisation en fosse septique des matières putrescibles s'effectue convenablement, les scories qui servent de supports aux microbes oxydants ne reçoivent que des eaux chargées de substances organiques *dissoutes* : elles ne se colmatent ou ne s'encrassent donc jamais et elles restent intactes pendant de longues années. Tout au plus doit-on, tous les 2 ou 3 mois, râcler leur surface au râteau et, tous les 4 ou 5 ans, retourner à la bêche leurs couches superficielles.

On pouvait craindre que, pendant les hivers rigoureux, la congélation des lits empêchât les phénomènes d'oxydation de se produire. L'expérience a prouvé que cette éventualité devait être écartée : les eaux d'égout sont toujours maintenues assez chaudes par les fermentations exothermiques qu'elles subissent, pour empêcher le gel des scories, et on a constaté en Angleterre que, même par les plus grands froids, la nitrification s'effectue avec une activité un peu ralentie mais suffisante pour assurer l'épuration.

Dans toutes les villes anglaises, déjà nombreuses, où le système biologique a été appliqué à l'épuration des eaux d'égout (Manchester, Exeter, Yeovil, Birmingham, York, Hampton, Huddersfield, Lincoln, Oldham, Oswestry, Sheffield), les autorités sanitaires sont unanimes à déclarer que ses résultats sont des plus satisfaisants. Les dispositions adoptées dans la plupart de ces villes sont cependant loin d'être parfaites et elles ne réalisent qu'incomplètement les 3 phases essentielles que j'ai décrites.

En certains endroits, comme à Hampton, on n'a aménagé ni chambres de décantation pour séparer les corps lourds imputrescibles, ni fosses septiques, et on reçoit directement l'eau d'égout sur une série successive de 3 étages de lits bactériens. Il en résulte que le premier lit fonctionne mal, se colmate et nécessite soit des périodes de repos prolongées, soit un labourage trop fréquent.

A Manchester même, où l'installation est, de beaucoup, la plus parfaite et la plus grandiose qu'on puisse voir, on a voulu utiliser comme fosses septiques, et par mesure d'économie, d'anciens bassins de précipitation chimique qui ne sont ni assez vastes ni assez profonds pour permettre la bonne marche des fermentations anaérobies. On a négligé aussi d'assurer, par des bassins de décantation préalable, la séparation des corps lourds, imputrescibles, de sorte que les fosses septiques reçoivent une grande quantité de sable, de scories et de charbon. Leur capacité volumétrique se trouve ainsi réduite en quelques semaines aux $\frac{2}{3}$ de la capacité initiale, et on est obligé de les vider, ce qui n'arrive jamais lorsqu'on prend soin, comme à Birmingham, de n'y admettre que des eaux bien décantées.

On discute encore la question très importante de savoir s'il

convient de couvrir les fosses septiques, comme le préconise Cameroun et le *Septic Tank Syndicate*, ou s'il est possible d'éviter cette dépense considérable en laissant une profondeur suffisante aux fosses septiques pour que les fermentations anaérobies s'y poursuivent régulièrement.

Enfin, une foule de systèmes, pour l'exploitation desquels leurs inventeurs ont pris des brevets, proposent de supprimer l'intermittence de fonctionnement des lits bactériens et de répartir l'eau d'égout à la surface de ces derniers à l'aide de moyens mécaniques souvent aussi compliqués qu'ingénieux (tourniquets hydrauliques, gouttières basculantes, etc.).

Tels sont les systèmes Stoddart, Wittaker-Bryant, Werner-Candy, etc.

*
* *

Installation expérimentale de la Madeleine

On voit donc combien sont nombreux les essais tentés par nos voisins d'Outre-Manche en vue d'appliquer le travail des microbes à l'épuration aussi complète et aussi rapide que possible des eaux d'égout.

En Allemagne et, plus encore, aux États-Unis, on se préoccupe activement de résoudre le même problème. Dunbar à Hambourg, Kinnicut à Worcester (États-Unis) ont publié, dans cet ordre d'idées, d'importants travaux dont nous devons faire notre profit.

En France, il n'est malheureusement pas douteux qu'un très petit nombre d'hygiénistes sont au courant de ces questions, pourtant d'une si haute portée. Dans les sphères officielles, on considère encore l'épandage comme réalisant l'idéal de la perfection, et sous prétexte qu'il donne d'excellents résultats partout où on dispose de terrains suffisamment vastes et perméables pour l'appliquer, comme à Paris et à Reims, on oublie trop que la plupart des grandes villes, pour les raisons que j'ai indiquées précédemment, sont dans l'impossibilité absolue d'y avoir recours.

J'ai donc pensé qu'il était nécessaire, non seulement de répandre dans nos milieux scientifiques les notions qui se dégagent déjà très nettes des travaux étrangers, mais d'instituer aussi chez nous, à proximité d'une grande ville industrielle et

d'un laboratoire bien outillé, de nouvelles recherches orientées dans la même direction. Grâce à la Caisse nationale des recherches scientifiques, qui a bien voulu mettre à ma disposition les crédits indispensables, et grâce aussi au mouvement d'opinion et de solidarité provoqué par le Consortium d'assainissement du Nord, sous l'impulsion énergique et dévouée de son président M. Ory, j'ai pu organiser à Lille tout un centre d'études pour cet objet.

Avec la collaboration de M. A. Buisine, professeur de chimie industrielle à la Faculté des Sciences, de M. le docteur Marmier, de MM. Rolants, Boullanger, Bonn, Constant et Massol, chimistes ou ingénieurs agronomes, et de M. Le Noan, conducteur des ponts et chaussées, j'ai tracé tout un programme de travaux dont les résultats devront être contrôlés par une commission supérieure composée des membres de la Caisse des recherches scientifiques et de délégués du Comité consultatif d'hygiène de France.

Je me suis proposé tout d'abord de réaliser à proximité de la ville de Lille, et en empruntant tout l'égout collecteur d'un de ses faubourgs, une grande expérience d'épuration d'eaux d'égout particulièrement difficiles à épurer à cause de leur concentration et de leur teneur élevée en résidus industriels de toutes sortes (brasseries, teintureries, filatures, usines métallurgiques). J'ai arrêté mon choix sur l'égout collecteur de la Madeleine, qui se déverse dans la Basse-Deûle en un point très voisin des fortifications de Lille, et dont le débit moyen oscille entre 500 et 700 mètres cubes par 24 heures.

J'ai donc loué sur la rive droite de la Basse-Deûle un terrain de 1,500 mètres carrés de superficie, surélevé d'environ 1^m,90 au-dessus du niveau supérieur de la rivière, et j'ai dérivé vers l'angle le plus élevé de ce terrain, la totalité de l'égout collecteur dont il s'agit. L'espace dont je disposais ainsi m'a permis d'aménager toute une installation d'expériences pour l'épuration biologique, chimique ou chimico-bactérienne, d'un volume d'eau d'égout tel qu'on ne puisse plus objecter qu'il s'agit là de simples essais de laboratoire. J'y trouvais en outre la possibilité d'expérimenter simultanément ou successivement, *sur la même eau d'égout*, tous les systèmes d'épuration qu'il était intéressant ou utile de mettre à l'étude. Je dressai donc mes plans de

manière à ce que cette même eau pût être soumise aux traitements ci-après :

1° Décantation des matières minérales non putrescibles, et séparation des corps flottants de plus de 5 centimètres de diamètre;

2° Fermentation anaérobie en fosse septique *ouverte* à l'air libre, de 3 mètres de profondeur;

3° Fermentation anaérobie en fosse septique *couverte* de 3 mètres de profondeur;

4° Oxydation de l'effluent de chaque fosse septique sur lits bactériens aérobie;

5° Épuration directe de l'eau d'égout sur lits bactériens, sans fermentation anaérobie en fosse septique;

6° Traitement initial des eaux d'égout par divers réactifs chimiques;

7° Oxydation sur lits bactériens aérobie de l'effluent chimique, après séparation des boues précipitées.

Les plans de cette installation d'expériences (v. fig. 1 et 2) indiquent très clairement la disposition respective des fosses septiques, l'une ouverte, l'autre couverte; celle du bassin collecteur destiné à recevoir les eaux sortant des fosses septiques et celle des lits bactériens de premier et de second contact, qui reçoivent les eaux à épurer du bassin collecteur.

Au point d'arrivée des eaux en D (fig. 1), celles-ci passent à travers une grille à larges mailles et pénètrent dans l'ouverture rectangulaire d'un déversoir qui permet d'en mesurer constamment le débit, soit par l'épaisseur de la lame d'eau déversée, soit au moyen d'un enregistreur de niveau, mû par un mouvement d'horlogerie.

Du déversoir, les eaux passent, à volume égal, dans leurs bassins de décantation ou chambres à sable (*uu*) qui ont chacune 2 mètres cubes de capacité, 1 mètre de profondeur et dont il est facile d'enlever, avec une drague à main, tous les corps lourds qui s'y déposent. Elles sont ensuite dirigées, toujours en volume égal, dans chacune des 2 fosses septiques dont la capacité volumétrique est de 250 mètres cubes, soit 500 mètres cubes pour les deux fosses. Leur profondeur utile est de 2^m,60. Elles sont munies de 5 cloisons incomplètes ou *chicanes* (fig. 2, coupe suivant CDEF) alternativement disposées de la

surface à 0^m,60 du fond, et du fond à 0^m,60 de la surface.

L'extrémité de chaque fosse septique opposée à celle où l'eau arrive est munie d'un déversoir F et H (fig. 1) qui prend seulement la nappe d'eau située à 0^m,50 de la surface, de manière à ne point entraîner les croûtes ni les matières grasses flottantes, dont la décomposition n'est pas achevée.

La fosse septique couverte est munie de 2 cheminées de 0^m,10 de diamètre (55, fig. 2, coupe suivant GH) permettant l'évacuation et l'analyse chimique des gaz qui résultent de la fermentation à l'abri de l'air.

Le bassin collecteur destiné à recevoir l'effluent de chacune des 2 fosses, ou, si l'on veut, directement l'eau d'égout brute, a 50 mètres cubes de capacité et seulement 0^m,40 de profondeur utile. Il commande les vannes de déversement sur les lits bactériens aérobies, de premier contact (*vv*).

Entre les lits de premier et de second contact, j'ai disposé une rigole permettant d'évacuer directement à la rivière l'eau sortant des premiers lits (par F et G) ou de diriger celle-ci à volonté sur chacun des 2 lits de second contact.

Les lits bactériens, au nombre de 4 (2 pour le premier et 2 pour le second contact), ont chacun 150 mètres cubes de capacité volumétrique et 50 mètres cubes de capacité utile, les deux tiers de la capacité volumétrique étant occupés par les scories. Le drainage et la distribution des eaux à leur surface est disposé, comme je l'ai indiqué précédemment, de manière à assurer une répartition aussi égale que possible de l'eau à épurer dans toute la masse des scories, et de manière à assurer, après chaque période d'immersion, la vidange rapide et l'aération facile des lits.

Les vannes de sortie après le second contact (^{oo}) déversent l'eau complètement épurée à la rivière (par *g.*). Une dérivation permet de recueillir dans un petit bassin spécial 2 mètres cubes d'eau épurée, afin de se rendre compte de son aspect et de son aptitude à permettre la vie des plantes et des poissons.

Une autre dérivation, avant l'entrée aux fosses septiques (en *b*), dirige vers deux bassins de précipitation chimique l'eau brute sur laquelle il s'agit d'expérimenter les divers réactifs chimiques dont l'emploi pourrait paraître avantageux.

Toute l'installation d'épuration bactérienne a été mise en

marche le 8 juillet. La maturation des lits bactériens exigeant environ 1 mois, je publierai seulement à la fin de cette année 1904 les premiers résultats d'ensemble que nous fourniront les analyses.

Je me borne à indiquer ci-dessous la composition moyenne des eaux de l'égout collecteur de la Madeleine à l'entrée des fosses septiques.

Ces eaux, dont l'aspect est noir et l'odeur putride sulfhydrique, ont une réaction le plus souvent alcaline, correspondant entre 35 et 365 milligrammes de carbonate de chaux par litre. Elles renferment de 235 à 882 milligrammes de matières organiques et de 0^{sr},670 à 1^{sr},367 milligrammes de matières minérales dissoutes, de 3 à 24 milligrammes d'ammoniaque libre ou saline et de 1 à 19 milligrammes d'azote organique.

Elles sont de beaucoup plus souillées que les eaux de la Deule dans laquelle elles se déversent et qui, à la même période, donnaient, à l'analyse, de 145 à 170 milligrammes de matières organiques et de 242 à 295 milligrammes de matières minérales dissoutes, avec 3 à 8 milligrammes d'ammoniaque libre ou saline et 0,7 à 3 milligrammes d'azote organique.

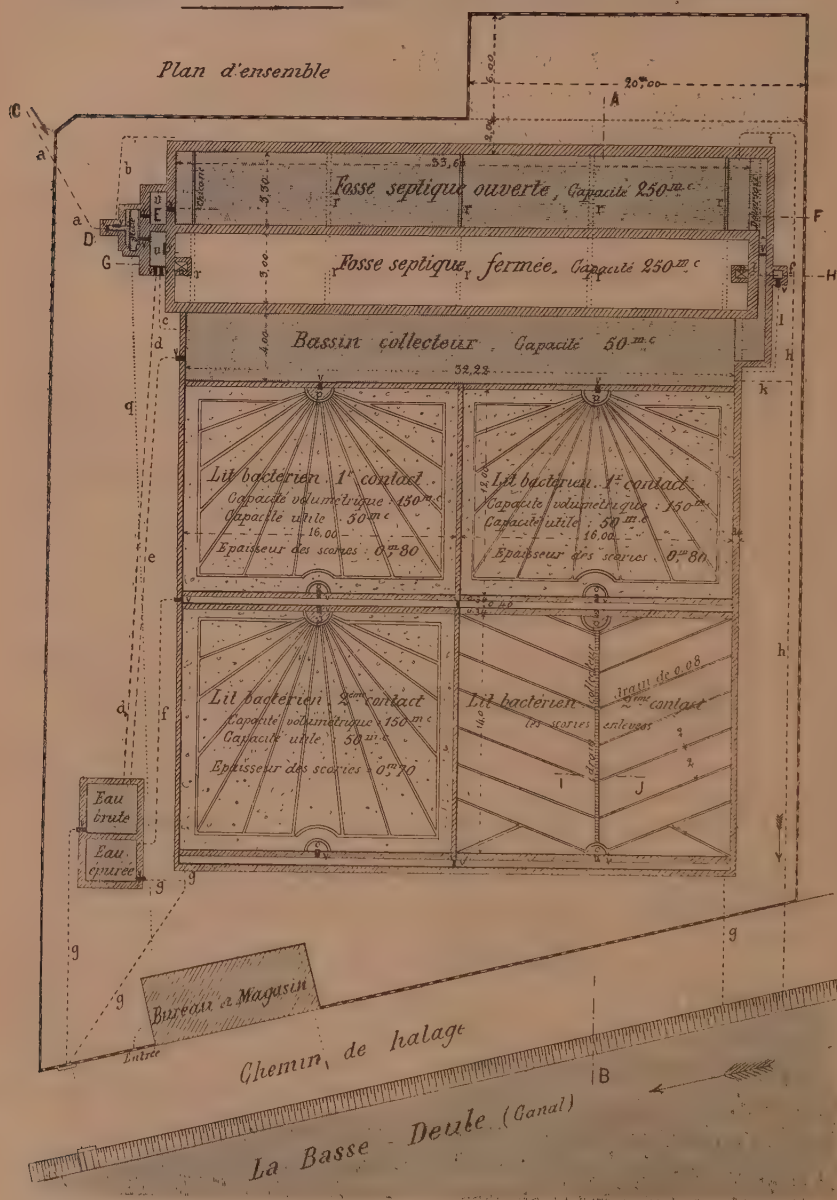
Épuration biologique appliquée aux eaux résiduaires industrielles.

En même temps que l'installation expérimentale de la Madeleine va permettre de réaliser sur une assez large échelle l'étude comparative des procédés biologiques, chimiques et chimico-bactériens appliqués à la même eau d'égout et à la totalité des eaux résiduaires d'une petite ville de 12.500 habitants, j'ai outillé spécialement un des laboratoires de l'Institut Pasteur de Lille en vue des recherches à entreprendre sur l'épuration des eaux résiduaires de chacune des grandes industries de la région du Nord de la France et sur la biologie des microbes nitrificateurs.

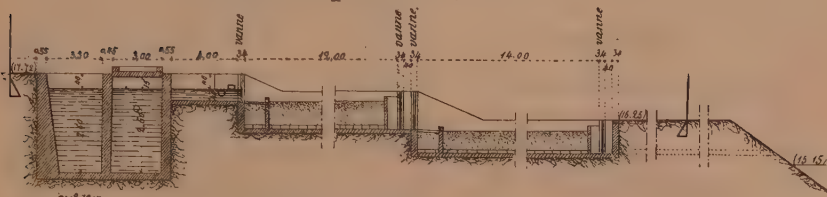
Actuellement, les industries puissantes qui enrichissent cette région sont obligées de se débarrasser de leurs eaux usées en les rejetant dans les rivières ou les canaux : il en résulte des inconvénients de toutes sortes dont le plus grave, en dehors

1. Voir BOUILLANGER, ces *Annales*, t. XVII, 1903, p. 492, et t. XVIII, 1904, p. 181.

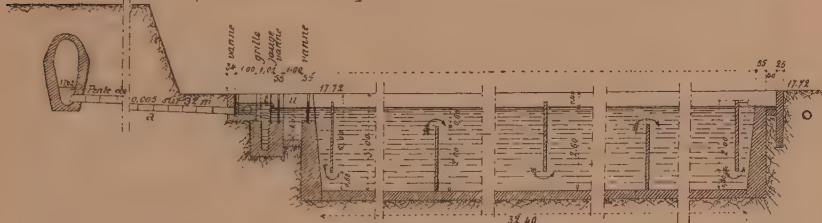
EMPLACEMENT POUR L'INSTALLATION DES EXPÉRIENCES D'ÉPURATION CHIMIQUE DE M. BUISINE



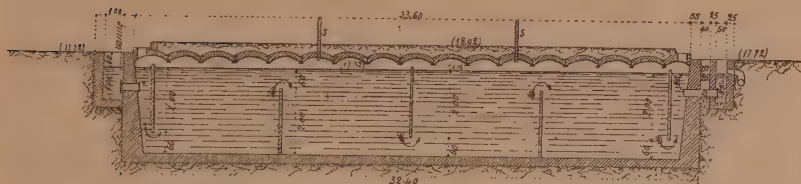
Coupe suivant AB, du plan d'ensemble
(L'échelle est double pour les hauteurs)



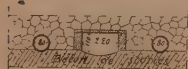
Coupe suivant CDEF du plan d'ensemble
(L'échelle est double pour les hauteurs)



Coupe suivant GH du plan d'ensemble
(L'échelle est double pour les hauteurs)



Drainage du fond des lits



Rigole à la surface des lits



Déversoir de trop plein



Déversoir de jauge
Elevation Coupe Cd



Coupe des scories
des lits



Légende

- a. Conduite d'arrivée des eaux
- b. id. pour l'installation de M. Bussine
- c. id. d'aménagement des eaux brutes dans le collecteur, sans passer par les fosses septiques
- d. id. d'aménagement des eaux dans le réservoir des eaux brutes
- e. id. des eaux du collecteur dans le réservoir des eaux brutes
- f. id. des eaux du collecteur id. eaux épurées
- g. Conduite d'installation à la Doule
- h. id. de trop plein
- i. trop plein de la fosse septique ouverte id. fermée
- j. tuyau d'aménagement des eaux de la fosse septique fermée dans collecteur
- k. trop plein du collecteur
- l. Canal d'aménagement des eaux de la fosse septique ouverte dans le collecteur
- m. Regard au-dessus de la fosse septique fermée
- n. Protège-rainne
- p. Déversoir de distribution sur les lits
- q. Tube de l'appareil enreguill de débit des eaux épurées
- r. Chicanes de fond et de superficie dans les fosses septiques
- s. Tuyau d'évacuation des gaz de la fosse septique fermée
- t. Chambre de la grille, du déversoir et de l'appareil de jauge 2'00 x 1'00
- u. Chambres à sable avec chicane
- v. Vannes de 0.25 d'ouverture

même de dangers pour la santé publique, est que les industries ne pourront bientôt plus trouver, dans les nappes souterraines polluées, assez d'eaux propres pour subvenir à leurs besoins.

Il était donc urgent d'aborder l'étude des moyens pratiques à proposer aux industriels pour leur permettre d'épurer leurs eaux usées, de manière à ce qu'ils puissent sans dommage, soit les rejeter dans les rivières, soit les utiliser de nouveau immédiatement.

A ce point de vue spécial, nous avons déjà obtenu des résultats très importants en ce qui concerne les eaux résiduaires de sucreries et celles d'amidonneries.

Nous avons entrepris pendant les deux dernières campagnes sucrières, avec la collaboration de MM. Leroux et Vié, ingénieurs, des essais d'épuration des eaux résiduaires de sucrerie à l'usine de la Société Say, à Pont-d'Ardres (Pas-de-Calais). Ces essais ont porté sur un volume d'environ 300 mètres cubes par jour.

Ils ont montré que les eaux résiduaires de sucrerie, que l'on rangeait jusqu'à ces derniers temps parmi les plus difficiles à épurer, sont parfaitement justiciables du système biologique, sous réserve de certaines modifications aux dispositifs habituellement employés pour les eaux d'égout.

Tout d'abord, il est indispensable de ne pas faire usage de fosses septiques avec ces eaux qui renferment presque exclusivement des matières hydrocarbonées telles que la cellulose, les matières pectiques et le sucre. L'emploi des fosses septiques aurait eu pour effet de développer des fermentations anaérobies *butyriques* et de donner naissance à des quantités considérables d'acide butyrique qui générerait par la suite les actions oxydantes sur lits bactériens à cause de son pouvoir antiseptique relativement élevé.

D'autre part, les eaux de presses à cossettes de sucreries étant très concentrées et riches en sucres (elles renferment par litre 4 à 6 gr. de matières organiques dont 2^{gr}8 à 3^{gr}2 de sucre et 3 à 6 gr. de pulpes flottantes), il est nécessaire de les diluer avec un tiers ou une moitié d'eaux provenant du lavage des betteraves, qui contiennent une quantité très grande de microbes du sol et qui facilitent puissamment l'action oxydante des lits bactériens.

On reçoit donc directement et successivement les eaux de presses à cossettes diluées sur une série de 3 lits bactériens aérobies. Elles séjournent 2 heures sur chaque lit et sortent du dernier contact sans trace de sucre. Le pourcentage de l'épuration totale sur chaque lit s'élève progressivement à :

30 0/0 après le premier contact ;

65 0/0 après le deuxième contact ;

90 0/0 et jusqu'à 92 0/0 après le troisième.

L'eau épurée n'est ni putrescible ni toxique pour les poissons, alors que ces derniers succombent presque instantanément quand on les plonge dans l'eau brute.

M. G. Barrois-Brame, fabricant de sucre à Marquillies (Nord), a bien voulu, lui aussi, essayer l'épuration bactérienne de ses eaux de presses à cossettes pendant la dernière campagne sucrière. Il a employé, pour cette expérience, trois bacs en tôle, de 5 mètres cubes environ de capacité chacun, surélevés en cascade au-dessus du sol. Au fond de chacun d'eux, on a disposé des drains et, au-dessus de ceux-ci, une couche de 1 mètre d'épaisseur de mâchefer.

J'ai fait laver les scories une fois par jour pendant une semaine avec de la délayure de terre arable, pour provoquer une multiplication plus rapide des microbes oxydants. On y a admis ensuite les eaux des presses à cossettes, d'abord diluées aux $\frac{2}{3}$ avec de l'eau de lavage de betteraves, puis diluées à $\frac{1}{2}$, puis diluées à $\frac{1}{3}$. Les résultats ont été identiques à ceux obtenus à la sucrerie de Pont-d'Ardres.

On peut donc considérer comme résolu le problème de l'épuration des eaux résiduaires des sucreries.

Nous entreprendrons ainsi successivement avec le concours d'industriels éclairés de la région du Nord, l'étude des meilleurs systèmes à employer dans les diverses industries, et nous publierons tous nos résultats d'expériences à mesure qu'ils nous paraîtront pouvoir servir de base à des applications définitives.

Nous espérons de la sorte, mes collaborateurs et moi, contribuer utilement aux progrès de nos connaissances sur l'assainissement des industries et des villes, et nous nous efforcerons de justifier la confiance que le Conseil d'administration de la Caisse des recherches scientifiques veut bien nous témoigner en nous accordant les moyens de poursuivre nos travaux,

L'Infection mixte dans la tuberculose chirurgicale

PAR LE D^r N. PETROFF (DE S^t PETERSBOURG)

Travail du laboratoire du professeur Metchnikoff

Le rôle important des associations microbiennes dans la tuberculose chirurgicale n'est plus méconnu de nos jours.

L'expérience journalière des chirurgiens, ainsi que plusieurs travaux de laboratoire, semblent avoir démontré que les foyers tuberculeux fermés et ouverts ont un pronostic très différent, que les divers microbes de l'infection secondaire exercent une influence considérable sur l'évolution même de la tuberculose. Mais, à part ces grands principes, on aurait de la peine à trouver un point important de cette intéressante question qui fût appuyé par des faits assez nombreux et bien établis pour ne pas donner lieu à des affirmations sensiblement divergentes.

Ainsi, pour ce qui concerne le contenu des foyers ouverts de tuberculose chirurgicale, les analyses bactériologiques, plutôt rares, ont été presque toujours exécutées pour ainsi dire en passant, au courant de différentes recherches, dont elles ne présentaient pas le but principal. (Babes, Pawlowsky, Verneuil et Béretta, Dor, Pasquale, Lannelongue et Achard.)

Pour les foyers fermés, les recherches ont été plus exactes (Garré, Hoffa, Lannelongue et Achard, Krompecher u. Zimmermann) et leurs résultats, à peu près identiques pour tous, permettaient d'affirmer l'absence de microbes associés dans l'immense majorité de ces foyers. Pourtant, dans une étude récente, V. Brunn serait parvenu à cultiver des streptocoques de 39 abcès froids suppurés, dans des cas d'adénites tuberculeuses du cou sans communication extérieure.

Voilà donc l'incertitude revenue dans ce domaine.

L'étude expérimentale de l'influence des associations microbiennes sur la tuberculose, inaugurée par Baumgarten en 1884, fut reprise par Pawlowsky, Prudden, Arloing et Nicolas, Ramond et Ravaut, Sata et Michelazzi.

Les auteurs ne sont pas unanimes à reconnaître la nocivité

de ces associations pour l'organisme. Selon Sata, une association de staphylocoques ou de streptocoques peu virulents pourrait même stimuler les forces de défense de l'organisme et prolonger sa lutte contre le mal envahissant (p. 142 et 170).

Des conditions comparables à la tuberculose chirurgicale humaine à infection secondaire furent créées par Pawlowsky et Ramond et Ravaut. Les expériences de ces auteurs semblent avoir démontré l'influence favorisante de l'infection mixte sur la marche du processus tuberculeux local et sur sa généralisation dans l'organisme. Seulement, les expériences de P. sont trop peu nombreuses (3 avec 1 témoin), quant à celles de R. et R., elles se rapportent à des injections répétées de microbes absolument dépourvus de virulence dans des foyers préalablement tuberculisés avec un mélange de bacilles tuberculeux et de ces mêmes microbes. Les résultats obtenus par ces auteurs sont relatés en termes très sommaires.

De nouvelles recherches sur la bactériologie des foyers ouverts et celle des foyers fermés et aussi une étude expérimentale furent entreprises par moi sur les avis et conseils de M. Metchnikoff.

Le matériel pour la presque totalité de mes recherches bactériologiques a été fourni par des malades du service du professeur Lannelongue à l'hôpital des Enfants malades. Le pus des abcès froids osseux, articulaires et ganglionnaires, prélevé au cours des opérations dans des pipettes stériles, futensemencé dans plusieurs tubes de gélose glycinée, où il fut réparti sur toute la surface du milieu après dilution dans l'eau de condensation. Les restes de pus furent employés à faire des frottis sur lames, examinés après coloration.

Les analyses de pus d'abcès ouverts comprennent 44 cas, dont trois seulement ne donnèrent aucun développement dans les milieux de culture. Dans ces cas-là, l'ensemencement ne put être réalisé qu'avec des quantités trop insignifiantes de pus. Les autres 41 cas donnèrent des colonies. Toutes les espèces microbiennes, arrivées au développement, furent isolées, et leur diagnostic précis fut obtenu à l'aide de cultures sur les différents milieux, souvent complétées par l'inoculation à des animaux.

23 fois nous rencontrâmes des staphylocoques (16 blancs,

6 dorés et 1 citrin), 18 fois des streptocoques, 8 fois des bacilles pseudo-diphthériques, 4 fois du bacille pyocyanique, 2 fois du tétragène, autant de sarcines, 1 fois le *bactérium coli* et encore plusieurs espèces saprophytes, dont nous ne pûmes déterminer la nature.

On voit que la fréquence relative des principaux microbes pyogènes dans les abcès froids ouverts correspond parfaitement à celle qui est observée dans les suppurations aiguës des mêmes régions. En effet, la grande statistique de Jakowski sur la bactériologie des suppurations aiguës, basée sur 827 cas, compte 605 cas de staphylocoques et 154 de streptocoques.

Afin d'élucider les rapports existant entre les microbes de l'infection secondaire et les tissus des abcès froids qui les contiennent, nous exécutâmes une série de recherches histologiques. A cet effet, des fragments de granulations, de membranes synoviales ou autres particules de la paroi des abcès, enlevées au cours des opérations, furent fixées par l'alcool, incluses dans la paraffine, divisées en coupes et étudiées après différentes colorations, propres à mettre en évidence les bactéries (méthodes de Ziehl, de Gram, bleu de Löffler, thionine). Or, parmi les 27 cas ainsi examinés, il ne s'en trouva qu'un seul (péritonite tuberculeuse ouverte, examen des fausses membranes), où les tissus contiennent des amas de bactéries (staphylocoques), entourés de foyers nécrobiotiques, dus à leur présence.

Dans la totalité des autres cas, il nous fut impossible de démontrer la présence de microbes dans les tissus; tout au plus s'il s'en trouvait de petits groupes isolés, situés au voisinage immédiat de la surface et n'ayant provoqué aucune réaction appréciable de la part des tissus environnants. Et pourtant, plusieurs de ces cas présentaient des signes d'acuité très prononcés et parfois avaient même provoqué des symptômes généraux d'infection pyogène. Notamment dans un cas de tuberculose du pied, ouverte et très enflammée, ayant nécessité l'amputation, un examen très minutieux des coupes de la synoviale (articulation tibiotarsienne) ne réussit pas à démontrer la présence de microbes dans l'épaisseur des tissus; cette synoviale baignait littéralement dans le pus contenant une association de staphylocoques, de streptocoques et de bacilles pyocyaniques.

Ceci nous porte à conclure que dans les foyers ouverts de

tuberculose chirurgicale, les microbes de l'infection secondaire, démontrés par l'ensemencement du pus, ne résident que rarement dans la profondeur des tissus en quantité notable.

Toutes les préparations examinées contenaient des tubercules typiques, mais les bacilles tuberculeux ne purent être mis en évidence que deux fois sur 27.

Si nous passons maintenant aux foyers fermés, nous nous trouvons en présence d'analyses bactériologiques portant sur 57 cas.

Autant que possible, la quantité de pusensemencée fut considérable, 1/2 c. c. et au delà; tous les pus des abcès fermés furent soumis à la culture aérobie (sur gélose glycinée) et anaérobie, après évacuation de l'air (sur gélose sucrée).

Parmi les 57 cas mentionnés, 49 ne donnèrent lieu à aucun développement de germes. 7 d'entre eux présentaient des signes locaux d'acuité et 3 avaient causé en outre une réaction fébrile générale.

Des faits analogues ont déjà attiré l'attention de Lan. et Ach., et d'autre part Koch a signalé l'apparition d'abcès stériles après l'introduction de bacilles tuberculeux tués (en suspension dans sa 2^e tuberculine) dans le tissu sous-cutané de l'homme.

L'injection dans les articulations de deux lapins, d'une émulsion de bacilles tuberculeux, détruits par la chaleur, m'a permis également d'assister à l'évolution d'arthrites, franchement aiguës au début et dont le pus ne fut pas cultivable.

Nous voyons donc que les données de la bactériologie clinique, ainsi que les résultats de l'expérimentation poussent à conclure que les bacilles tuberculeux sont capables — de par l'action des produits élaborés pendant leur vie, ou provenant de la destruction de leurs corps — de produire des poussées inflammatoires aiguës sans la concurrence de microbes associés quelconques.

Les résultats positifs des cultures de pus d'abcès froids fermés sont au nombre de 8, (3 staphylocoques blancs, 2 streptocoques, 2 microcoques sans virulence et ne liquéfiant pas la gélatine, et un bacille saprophyte indéterminé).

Mais dans aucun de ces huit cas l'analyse bactériologique ne fut exempte de causes d'erreur. Les uns notamment avaient été ponctionnés dans un passé plus ou moins proche; les autres, intacts eux-mêmes, avoisinaient des trajets fistuleux et des

excoriations de la peau, ce qui rendait impossible le prélèvement stérile du pus des foyers en question. Ainsi nous ne réussîmes pas une seule fois à trouver des microbes associés dans des abcès froids fermés recouverts et entourés de peau saine.

Ce résultat, en conformité absolue avec les données de presque tous les auteurs, est en opposition avec les conclusions déjà mentionnées de V. Brunn. L'auteur allemand a trouvé des streptocoques dans la totalité de 39 adénites tuberculeuses suppurées du cou. Or, parmi nos cas d'abcès fermés, il y avait 11 adénites du cou, dont trois seulement contenaient des microbes et encore l'analyse en fut faite dans les conditions défectueuses ci-dessus indiquées; 2 de ces 11 adénites étaient en un état de colliquation très prononcé, et ne contenaient pas de germes cultivables.

Il est très probable que les résultats étonnants des recherches de V. Brunn sont dus à l'infection des ganglions cervicaux de ses malades par des microbes provenant de la cavité buccale (ce qu'il admet lui-même) grâce à des particularités dans l'état de cette cavité, ainsi que dans la nourriture des malades.

Les recherches bactériologiques ci-dessus exposées nous ayant fixé sur la nature et les particularités de l'infection mixte dans la tuberculose chirurgicale, nous entreprîmes l'étude expérimentale de la question.

A cette fin nous pratiquâmes l'infection artificielle des articulations du genou chez des lapins et ceci pour les raisons suivantes: 1° la tuberculose articulaire est l'une des formes les plus communes, souvent très graves, de cette maladie chez l'homme; 2° la présence de deux articulations homonymes chez chaque animal permet d'observer l'influence produite par l'infection secondaire sur l'une d'elles, pendant que l'autre reste purement tuberculeuse; 3° les articulations du genou de lapins offrent toutes les commodités pour le dosage exact des matières à inoculer.

Des inoculations de 1/3 de c. c. d'une émulsion de bacilles tuberculeux humains furent donc pratiquées sur deux séries d'animaux, dans les deux articulations du genou de chaque animal. Une partie des animaux, servant de témoins, fut abandonnée à elle-même, le reste fut soumis à une infection secondaire de l'un des genoux tuberculisés, par l'inoculation de

différents microbes : streptocoque, staphylocoque, bacille pyocyanique, *bacterium coli*, microcoque tétragène. Tous ces microbes, à l'exception du tétragène, provenaient de nosensemencements de produits tuberculeux humains.

L'autopsie des animaux fut toujours suivie de l'excision des deux articulations malades, lesquelles furent fixées, décalcifiées, incluses dans de la celloïdine, divisées en coupes et examinées au microscope à faible grossissement.

Dans tous les cas où l'infection secondaire avait eu une durée assez prolongée (nos 4, 6, 8, 12, 20 du tableau), cet examen révéla la présence de foyers de granulations et de destruction bien plus considérables dans les articulations infectées secondairement que dans celles qui étaient restées purement tuberculeuses. Notamment les cartilages et les épiphyses osseuses, faisant partie des articulations à infection double, étaient toujours attaquées par le processus destructif, tandis que dans les articulations à infection tuberculeuse pure ce n'étaient que les synoviales et les ligaments intra-articulaires, c'est-à-dire les tissus moins résistants, qui avaient souffert de la maladie.

L'examen bactériologique du pus des articulations à infection secondaire démontra, dans tous les cas, la présence du microbe respectif en culture pure.

Le tableau ci-dessous servira à exposer l'influence de l'infection secondaire sur la généralisation de la maladie.

On voit bien qu'une infection secondaire, associée à la tuberculose articulaire, accélère notablement la généralisation de la tuberculose primitive, qui se localise dans les poumons.

Cette accélération est due à deux causes : l'une, c'est l'affaiblissement de l'organisme, attaqué par une infection secondaire, l'autre, et probablement la plus importante, c'est le changement subit, apporté par l'infection secondaire à l'évolution de la tuberculose locale. Celle-ci, en effet, se déroulant lentement, laisse à l'organisme pleine faculté de créer, à l'aide d'un processus inflammatoire chronique, une barrière, un vrai rempart contre la propagation des bacilles tuberculeux; or l'association d'une infection aiguë et destructive produit des brèches dans ce rempart longuement constitué et les bacilles tuberculeux, entraînés par un courant libre de leucocytes,

gagnent le système circulatoire et se propagent dans l'organisme.

Les ganglions lymphatiques du fémur, de l'aîne et autres, n'étaient pris dans aucun de nos cas et l'organe unique qui avait contracté la tuberculose était le pòumon.

Ces faits se trouvent en parfaite conformité avec une série d'observations, recueillies dans ma thèse; leur nombre total, dépassant maintenant la cinquantaine, me paraît suffisant pour établir que la tuberculose articulaire se propage habituellement par la voie des vaisseaux sanguins et non par celle des vaisseaux lymphatiques, comme le prétendait Pawlowsky.

Les microbes de l'infection secondaire ne purent être retrouvés que deux fois à l'examen des frottis et des coupes des foyers tuberculeux pulmonaires; il paraît donc que, dans la majorité des cas, le bacille tuberculeux fut seul à se propager, l'infection secondaire restant localisée dans l'articulation.

Aucun symptôme, indiquant un avantage quelconque retiré par l'organisme du fait de l'association microbienne, ne se présentait à notre observation.

Les conclusions générales de mon travail sont les suivantes :

1^o Les foyers fermés de tuberculose chirurgicale, n'ayant subi aucune intervention chirurgicale, recouverts et entourés de peau saine, ne contiennent pas, dans la grande majorité des cas, de microbes associés aérobies ou anaérobies. Ces foyers peuvent présenter des signes d'acuité très prononcés;

2^o Les foyers ouverts de tuberculose chirurgicale contiennent toujours des microbes associés, qui sont pour la plupart des cocci pyogènes à faible virulence; ces derniers sont rares dans l'épaisseur des tissus;

3^o Les associations microbiennes exaltent la destructivité de la tuberculose articulaire et accélèrent sa généralisation dans l'organisme. Le premier organe envahi par la tuberculose est le pòumon; donc la généralisation suit le cours de la circulation sanguine. Les microbes associés ont une tendance beaucoup moindre à la propagation, tout en restant vivants dans les articulations inoculées;

4^o Le fait clinique bien connu de la malignité plus considérable des formes ouvertes que des formes fermées de la tuber-

1 ^{re} SÉRIE	POIDS des animaux lors de l'inf. tubercul.	POIDS lors de l'infec. secondaire.	NOMBRE des jours de survie à l'infection tubercul. secondaire.	CAUSE de la mort et poids des cadavres.	ÉTAT DES ORGANES INTERNES
Témoins	1. 1.700 2. 1.720		27 23	Diarrhée. . . 1.420 Tué 1.360	Sans traces de tuberculose.
Inoculation second. de 4/15 c. c. de culture de <i>bac.</i> <i>pyocygn.</i> dans 1 genou . .	3. 1.810 4. 1.970	1.680 1.730	11 23	Septémie. Tub. pulm. 1.550	Sans traces de tuberculose. Les deux poumons criblés de tubercules.
Inoculation second. de 1/24 c. c. de culture de <i>sta-</i> <i>phyt. blanc</i> dans 1 genou . .	5. 1.550 6. 1.510	1.750 1.820	32 33	Tué 1.575 Tué 1.825	Tubercules nombreux dans les deux poumons. Une dizaine de tuberc. dans les deux poumons.
Inoculation second. de 1/20 c. c. de culture de <i>b. coli.</i>	7. 1.980 8. 1.630	1.530 1.800	16 33	Diarrhée . . 1.360 Tué 1.650	Sans traces de tuberculose. 3-4 tuberc. solitaires et plusieurs miliaires dans les deux poumons.
2 ^e SÉRIE	9. 1.345 10. 1.870		15 57	Diarrhée. . . 1.260 Tué 2.350	Sans traces de tuberculose. Poumon gauche sain, poumon droit contient un groupe de 3 petits tubercules.
Témoins	11 1.120		66	Tué 2.130	2 tuberc. solitaires et 4-5 miliaires dans les deux poum.
Inoculat. secondaire de 1/20 c. c. de culture sur bouillon de <i>bac. pyocyga-</i> <i>nique</i> dans 1 genou	12* 1.750 13. 2.310 14. 2.240	1.550 2.080 1.950	58 46 58	? 1.400 Tub. pulm. 4.630 Tué 1.900	Poumon droit sain, poumon gauche contient 3-4 tuber- cules miliaires. Les deux poumons criblés de tubercules. Plusieurs groupes de tuberc. solitaires aux centres caveaux, dans les deux poumons.
Inoculat. secondaire de 1/10 c. c. de culture sur bouillon de <i>streptocoques</i> dans 1 genou	15. 2.330 16. 2.170	2.120 1.890	35 57	Tub pulm. 1.420 Tué 1.870	Les deux poumons criblés de tubercules. Les deux poumons contiennent des tubercules très nombreux.
Inoc. sec. de 1/20 c. c. de <i>de staph. blanc</i> (cult. sur bouillon) dans 1 genou . .	17. 2.550 18. 2.500	2.450 1.780	18 27	Septémie. { 2.020 1.670	Pleur-pneumonie septique des deux poumons; il est impossible de dire s'il existe ou non quelque tubercule dans les poumons.
Inoculat. secondaire de 2,3 c. c. de <i>tetragènes</i> dans 1 genou	19. 2.095 20. 2.060	1.770 1.635	66 66	Tués 1.800	Plusieurs groupes de tubercules solitaires et miliaires dans les deux poumons. Plusieurs tubercules solitaires (2-3), et plus, miliaires dans les deux poumons.

* Cet animal, comme étant mort après 9 jours d'infection secondaire et 58 de tuberculeuse, pourrait être rangé parmi les témoins.

culose chirurgicale trouve une explication parfaitement suffisante dans l'infection secondaire.

Le traitement rationnel de ces formes ouvertes, ayant deux buts à atteindre : guérir le processus local et empêcher sa généralisation, doit donc toujours être guidé par l'idée maîtresse de l'aseptisation des foyers dans la mesure du possible.

BIBLIOGRAPHIE

- ARLOING et NICOLAS, *De l'influence d'une infection streptococcique*.... (4^e Congrès pour l'étude de la tuberculose, Paris, 1898.)
- BABES, *Sur les associations microbiennes*.... (1^{er} Congrès p. l'ét. de la tub., Paris, 1891.)
- BAUMGARTEN, Ueber die Uebertragung. (*Cbltf. Klin. Medic.*, 1884, n^o 2.)
- V. BRUNN, *Pathol.-anat. Arbeiten... Orth-gewidmet Gestschrift*, 1903.)
- DOR, 2^e Congrès p. l'étude de la tuberculose, Paris, 1893.
- HOFFA, Bakteriologische Mittheilungen. (*Fortschritte der Medicin*, 1886, n^o 3.)
- PARRÉ, Zur Aetiologie der kalten Abscesse. (*Deut. Med. Woch.*, 1886, n^o 34.)
- JAKOWSKI, Die Ursachen der Eiterung. (*Ziegler's Beiträge*, 1894, Bd. XV.)
- KOCH, Ueber neue Tuberkulinpräparate. (*D. Med. Woch.*, 1897, n^o 44.)
- KROMPECHER u. ZIMMERMANN, Untersuchungen über die Virulenz.... (*Cblt f. Bakter.*, 1903, XXXIII, n^o 8.)
- LANNELONGUE et ACHARD, Associations microbiennes.... (*C. R. de l'Acad. des Sciences*, n^o 122, 1896.)
- MICHELAZZI, Intorno all' influenza.... (*Riforma medica*, 1902, n^o 239-42.)
- PASQUALE, Refer.... (*Cblt. f. Bakter.*, 1894.)
- PAWLOWSKY, Sur les formes mixtes de la tuberculose des articulations.... (*Annales Pasteur*, 1889.)
- PAWLOWSKY, Sur l'histoire du développement.... (*Ann. Past.*, 1892.)
- PÉTROFF, *Thèse de Saint-Petersbourg*, pages 94-96, 1902. (En russe.)
- PRUDDEN, Concurrent infections and the formation of cavities. (*New-York Med. Journ.*, 1894, vol. LX, July 7.)
- RAMOND et RAVAUT, Action des microbes.... (*Arch. de Med. expér.*, 1899.)
- SATA, *Ueber die Bedeutung der Mischinfection*.... Iéna 1899.
- VERNEUIL et BÉRETTA, *Influence des associations microbiennes*.... (1^{er} Congrès pour l'étude de la tuberc., Paris, 1891.)

Les Anticorps contre les spirilles de la septicémie des poules.

PAR LE D^r C. LEVADITI.

(Laboratoire de M. Metchnikoff.)

I

L'importance des études concernant l'origine des anticorps n'est plus à discuter. Ces études, précisant quel est l'organe ou la catégorie cellulaire qui, chez les animaux immunisés, se charge d'élaborer les substances spécifiques des *immun-séra*, permettent de pénétrer plus intimement le mécanisme qui préside à la fabrication de ces substances. Or, on est encore loin d'être d'accord sur la nature de ce mécanisme, qui varie suivant les diverses théories de l'immunité.

Si le lieu d'origine des antitoxines, étant donnée la difficulté du problème, est relativement peu précisé, celui des précipitines a été récemment déterminé d'une façon certaine par MM. Kraus et Levaditi². Ces auteurs ont prouvé que les leucocytes qui absorbent les principes protéiques d'espèce étrangère, injectés dans la cavité péritonéale, s'accumulent dans l'épiploon, où ils élaborent des précipitines capables d'agir d'une façon spécifique sur ces albumines.

Mais c'est surtout l'origine des anticorps bactériolytiques qui est mieux précisée à l'heure actuelle. Pfeiffer et Marx³ ont été les premiers à déterminer cette origine pour les bactériolysines anticholériques. Leurs recherches, restées classiques, ont prouvé que de tous les organes provenant des lapins immunisés contre le vibron cholérique, les leucocytes du sang y compris, seuls la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques, interviennent d'une façon active dans la production des choléra-

1. Ce travail fait partie d'une série de recherches que Kraus et Levaditi se sont proposé d'entreprendre dans le but de préciser le rôle des leucocytes dans la production des anticorps.

2. KRAUS ET LEVADITI, *C. R. de l'Acad. des Sciences*, séance du 5 avril 1904.

3. PFEIFFER ET MARX, *Zft. für Hygiene*, vol. XXVII, 1898; p. 272.

anticorps. D'un autre côté, M. Wassermann, dans une série d'études concernant la production des substances immunisantes contre le b. typhique¹ et le pneumocoque², a démontré que si le sang, le cerveau, la moelle épinière, les muscles, le foie et le rein se montrent presque dépourvus de qualités préventives, par contre ces qualités apparaissent d'une façon frappante dans le thymus, la rate et surtout la moelle osseuse. Enfin, à cet ordre de recherches se rattachent les constatations de Deutsch³, d'après lesquelles la rate doit être considérée comme une source principale d'anticorps, chez les lapins immunisés contre le bacille typhique.

Il résulte de ces observations que les organes qui produisent les substances actives des immun-séras sont le thymus, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate. Ces organes sont reliés entre eux par un trait commun, la leucopoïèse, et ce fait, dont l'importance ne saurait être méconnue, conduit à penser que le système leucocytaire est le véritable producteur des anticorps bactériolytiques. C'est là l'interprétation la plus simple des résultats recueillis par les auteurs cités. Néanmoins, pour des motifs que nous aurons à examiner au cours de ce mémoire, cette interprétation n'est pas acceptée d'une façon unanime par les savants qui se sont occupés de cette question.

II

Les recherches qui font le sujet de ce travail ont été entreprises avec le spirille décrit récemment par Marchoux et Salimbeni⁴, et étudié au point de vue du mécanisme de la crise, par nous-même⁵. On savait, depuis les constatations de Metchnikoff, de Sawtchenko⁶ et de Marchoux⁷ que l'injection à des mammifères (lapin et cobaye) de sang d'oiseaux riche en spirilles (spirille de Sacharoff, spirille de Marchoux et Salimbeni), est rapidement suivie d'une formation d'anticorps spécifiques⁸. Ces anticorps manifestent leur action élective sur les spiro-

1. A. WASSERMANN, *Berl. kl. Woch.*, 1898, n° 10, p. 209.

2. A. WASSERMANN, *Deutsche med. Woch.*, 1899, n° 9, p. 141.

3. L. DEUTSCH, *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, p. 689.

4. MARCHOUX ET SALIMBENI, *Ces Annales*, vol. XVII, 1903, p. 569.

5. LEVADITI, *Ces Annales*, vol. XVIII, 1904, p. 129.

6. SAWTCHENKO, *Arch. russes de Pathol.*, 1900, p. 573.

7. MARCHOUX, communication orale.

8. Ces anticorps sont identiques à ceux découverts par Gabritchewsky dans le sang des oies infectées par le spirille de Sacharoff.

TABLEAU N° I.

ORGANE	LAPIN TÉMOIN		LAPIN 35. LE 3 ^e JOUR		LAPIN 88. LE 5 ^e JOUR		LAPIN 32. LE 7 ^e JOUR	
	Mobilité.	bact. 1 in vivo.	Mobilité.	bact. in vivo.	Mobilité.	bact. in vivo.	Mobilité.	bact. in vivo.
Foie.	Mobiles.	+ le 7 ^e j.	Mobiles.	+ le 4 ^e j.	Mobiles.	+ le 6 ^e j.	Mobiles.	+ le 6 ^e j.
Rein.	Mobiles.	+ le 8 ^e j.	Mobiles.	—	Mobiles.	+ le 6 ^e j.	Mobiles.	+ le 7 ^e j.
Ganglions. ²	Mobiles.	+ le 7 ^e j.	Mobiles.	+ le 4 ^e j.	?	+ le 5 ^e j.	Mobiles.	+ le 6 ^e j.
Rate.	Mobiles.	+ le 5 ^e j.	Mobiles.	+ le 4 ^e j.	Mobiles.	+ le 6 ^e j.	Immob.	+ le 5 ^e j.
Epiploon.	Mobiles.	+ le 7 ^e j.	Mobiles.	+ le 7 ^e j.	Mobiles.	+ le 7 ^e j.	Part. Immob.	+ le 2 ^e j.
Sérum.	Mobiles.	+ le 7 ^e j.	Mobiles. faibl. aggl.	+ le 6 ^e j.	?	O	Immob.	O

1. + signifie mort; O signifie survie sans infection.

2. Pancreas Asseli.

chètes, soit en immobilisant ces vibrions, soit en conférant une immunité passive aux animaux sensibles à l'égard de la septicémie spirillique. Il nous a semblé intéressant d'étudier le lieu de formation de ces anticorps, dans l'organisme du lapin vacciné contre les spirilles de la septicémie brésilienne et, pour ce faire, nous avons procédé de la façon suivante :

Méthode. — Plusieurs lapins du même poids recevaient dans le péritoine de 15 à 25 c. c. de sang riche en spirilles, provenant d'une poule sacrifiée au 3^e jour de l'infection. Quelque temps après l'inoculation, on saignait à blanc ces lapins et on prélevait les divers organes pour la préparation des extraits. Ces extraits étaient obtenus en triturant les organes avec de la poudre de verre dans des mortiers stériles, en émulsionnant la bouillie cellulaire dans de l'eau salée à 8 p. 0/00, et en laissant macérer ces mélanges à 38° pendant 2 à 3 heures¹. A la fin de l'opération et après décantation, on filtrait les liquides à travers du papier, et on obtenait ainsi des produits clairs, ne renfermant que très peu de débris cellulaires.

Le pouvoir immobilisant de ces extraits d'organes vis-à-vis des spirilles, était apprécié en mélangeant des quantités variables de liquide actif, à une dose donnée de sang spirillé (d'habitude 4 gouttes). L'observation microscopique avait lieu après une heure et demie de contact à 38°. D'un autre côté, on examinait la virulence des spirilles ayant subi l'influence des extraits d'organe, en injectant les mélanges de ces extraits et de spirochètes à des dominos, des capucins et des petits poussins.

RÉSULTATS OBTENUS

Série A, expériences I, II et III.

3 lapins ayant reçu dans la cavité péritonéale 25 c. c. de sang spirillé sont sacrifiés le 3^e, le 5^e et le 7^e jour. On apprécie le pouvoir immobilisant des extraits d'organes et du sérum provenant de ces lapins et d'animaux témoins; on détermine en même temps le pouvoir bactéricide *in vivo* de ces extraits, en se servant de capucins (v. tableau n° I).

Cette expérience permet de tirer les conclusions suivantes :

1^o Le 3^e jour, aucune formation d'anticorps n'a eu lieu dans les organes et le sérum des lapins sacrifiés.

2^o Le 7^e jour, l'extrait de *rate* immobilisait les spirilles, et il en était de même, quoique à un plus faible degré, de l'extrait d'*épiploon*.

3^o Le 5^e et le 7^e jour, le sérum entravait l'apparition de la maladie chez les oiseaux inoculés, cela à un moment où aucun

1. L'émulsion était faite dans une proportion de 10 gr. d'organe pour 100 c. c. de solution salée.

des organes examinés ne montrait la moindre propriété bactéricide appréciée *in vivo*.

Si ces résultats prouvent que la rate et l'épiploon peuvent être considérés jusqu'à un certain point comme un dépôt, sinon comme une source d'*immobilisines*, ils ne tranchent nullement la question de l'origine des principes bactériolytiques du sérum. A l'encontre de ce sérum, aucun des organes étudiés n'a fourni des extraits capables de sauver la vie des animaux qui recevaient en injection sous-cutanée, le mélange de virus et d'extrait. Après quelques tâtonnements, nous nous sommes aperçus que notre dispositif expérimental était insuffisant, et dans la suite, nous avons pu éviter la cause d'erreur qui rendait peu démonstratifs les résultats obtenus. Nous avons constaté, en effet, que si les extraits des organes leucopoïétiques (rate, moelle osseuse, ganglions lymphatiques), employés tels que, étaient dépourvus de qualités immobilisantes et microbicides à l'égard des spirilles, malgré leur richesse en anticorps, cela tenait au fait que ces extraits manquaient presque complètement de cytase (complément). *Faute de cytase, la sensibilisatrice contenue dans ces extraits, était incapable d'exercer son action spécifique sur les spirilles*, comme il résulte des expériences suivantes :

Série B, Expériences IV, V et VI.

3 lapins reçoivent dans la cavité péritonéale 20 c. c. de sang riche en spirilles. Ils sont sacrifiés le 2^e, le 3^e et le 5^e jour. On apprécie le pouvoir immobilisant du sérum et des extraits d'organes, en présence du complément de lapin (v. tableau n° II).

Il résulte de cette expérience que 5 jours après l'inoculation du sang riche en spirilles, *la rate, les ganglions lymphatiques, l'épiploon et la moelle osseuse*, à l'encontre du foie et du rein, renferment une quantité suffisante de sensibilisatrice, pour provoquer l'immobilisation des spirochètes, en présence de la cytase de lapin. Par contre, le 2^e et le 3^e jour, l'ambocepteur est absent dans les extraits de ces organes.

TABLEAU N° II.

ORGANES	EXTRAIT ou SÉRUM	CYTASE	LAPIN N° 30. Le 2 ^e jour.	LAPIN N° 60. Le 3 ^e jour.	LAPIN N° 90. Le 6 ^e jour.
Foie.	2,0	0,5 0,25 0	Mobiles.	Mobiles.	Mobiles.
Rein.	2,0	0,5 0,25 0	Mobiles.	Mobiles.	Mobiles.
Rate.	2,0	0,5 0,25 0	Mobiles.	Mobiles.	Immobiles. Immobiles. Mobiles.
Ganglions.	2,0	0,5 0,25 0	Mobiles.	Mobiles.	Immobiles. Immobiles. Mobiles.
Moelle osseuse.	2,0	0,5 0,25 0	Mobiles.	Mobiles.	Immobiles. Immobiles. Mobiles.
Epiploon.	2,0	0,5 0,25 0	Mobiles.	Mobiles.	Immobiles. Immobiles. Mobiles.
Sérum au 10°.	2,0	0,5 0,25 0	Mobiles.	Mobiles.	Immobiles.
Cytase.	0	0,5 0,25	Mobiles.	Mobiles.	Mobiles.
Contrôle.	0	0	Mobiles.	Mobiles.	Mobiles.

Série C, expériences VII, VIII, IX et X.

Dans une autre série d'expériences, 4 lapins reçoivent en injection intrapéritonéale 20 c. c. de sang riche en spirilles; ils sont sacrifiés le 3^e, le 4^e, le 7^e et le 8^e jour. Nous ne reproduisons ici que les résultats qui concernent les propriétés spirillicides des extraits d'organes et du sérum, apprécies *in vivo*. (Injection des mélanges à des jeunes poussins, à la dose de 1,5 c. c. (v. tableau n° III).

TABLEAU N° III.

2,0 EXTRAIT + 0,5 CYTASE	LAPIN 32. Le 3 ^e jour.	LAPIN 41. Le 5 ^e jour.	LAPIN 80. Le 7 ^e jour.	LAPIN 91. Le 8 ^e jour.
Foie.	+ le 7 ^e jour.	Infect. grave 1. Crise le 5 ^e jour.	+ le 4 ^e jour.	+ le 8 ^e jour.
Rein.	+ le 6 ^e jour.	+ le 8 ^e jour.	Crise le 5 ^e jour. Infection grave.	+ le 4 ^e jour.
Muscles.	—	—	+ le 5 ^e jour.	Crise le 5 ^e jour.
Rate.	+ le 5 ^e jour.	+ le 7 ^e jour.	O	O
Ganglions.	—	+ le 5 ^e jour. Infection légère.	Infection légère. Crise le 7 ^e jour.	—
Moelle osseuse.	+ le 5 ^e jour.	O	+ le 8 ^e jour.	O
Épiploon.	—	O	+ le 6 ^e jour.	+ le 8 ^e jour.
Sérum au 10 ^e	+ le 5 ^e jour.	O	O	O
Cytase seule.	+ le 3 ^e jour.	+ le 6 ^e jour.	+ le 5 ^e jour.	+ le 6 ^e jour.

Ce tableau, ainsi que le protocole concernant le pouvoir immobilisant des extraits d'organes, permettent de formuler les conclusions suivantes :

1° Les *immobilisines* font leur apparition dans les extraits préparés avec les organes hématopoïétiques (rate, moelle osseuse et ganglions) et l'épiploon, quatre jours après l'injection des spirilles. Par contre, les tissus témoins (foie, rein et muscle) sont dépourvus de principes actifs, ou n'en renferment que des traces, cela surtout chez les lapins sacrifiés à une période tardive de l'immunisation ;

2° Le pouvoir microbicide des extraits d'organes hématopoïétiques, apprécié *in vivo*, est nul au 2^e jour, et n'apparaît d'une façon frappante dans la *rate* (lapins n° 80 et 91), la *moelle*

1. Nous désignons sous le terme d'*infection grave*, les cas où la quantité des spirilles du sang était considérable ; *infection légère*, signifie que l'apparition des spirochètes dans le sang a été tardive et le nombre des vibrions relativement faible.

osseuse (lapins n° 41 et 91) et l'épiploon (lapin n° 41) que plus tard. A ce moment, les extraits des organes témoins se montrent entièrement inactifs; *les extraits de la moelle osseuse et de l'épiploon*

3° L'influence de la cytase ressort d'une façon très manifeste de ces recherches. Ainsi, la plupart des organes hématopoïétiques immobilisent rapidement les spirilles en présence de la cytase de lapin et cependant ces organes se montrent sans action si on les emploie tels quels. La moelle osseuse de lapin 91, sacrifié le 8^e jour, fait seule exception, en ce sens qu'elle arrête les mouvements des spirilles même en l'absence du complément. Mais cela s'explique, si l'on tient compte du fait que cette moelle, qui provient d'un animal immunisé depuis longtemps, renferme une quantité relativement considérable de sensibilisatrice, capable d'être réactivée par le peu de cytase que contient l'extrait de ce tissu médullaire.

III

L'ensemble de ces constatations prouve d'une façon non douteuse, que *seuls les organes leucopoïétiques fournissent des extraits capables d'immobiliser les spirilles en présence de la cytase, et de préserver la vie des animaux sensibles à la septicémie brésilienne*. Par contre, les tissus qui n'ont aucune relation avec la leucopoïèse, sont totalement dépourvus de propriétés microbicides. On est ainsi conduit à penser que ces organes sont, chez les organismes activement immunisés, une source principale d'anticorps, en ce sens qu'ils sécrètent ces anticorps et les déversent dans le plasma sanguin. Néanmoins, le fait que, dans ces recherches, le sérum des lapins dont les tissus leucopoïétiques renfermaient la sensibilisatrice spirillicide, était également pourvu de propriétés immunisantes, n'est pas sans soulever certaines objections contre cette interprétation. On peut se demander, en effet, si la présence de l'ambocepteur dans les extraits actifs, ne doit pas être attribuée aux traces de sang qui restent dans les organes après la saignée toujours incomplète, des animaux en expérience. Il suffit pourtant de considérer de plus près les conditions où nous avons opéré, pour s'apercevoir que cette objection est dénuée de fondement et qu'elle peut être facilement écartée. *et comme nous l'avons vu, les*

Tout d'abord, en procédant comme nous l'avons fait, il arrive que certains lapins immunisés soient sacrifiés à un moment où les organes leucopoïétiques renferment des anticorps actifs, cependant que le sérum sanguin en est entièrement dépourvu. Voici un exemple de ce genre.

Expérience XI. — Un lapin reçoit dans le péritoine 25 c.c. de sang de poule, riche en spirilles. Il est sacrifié le 4^e jour après l'injection. On apprécie le pouvoir microbicide *in vivo* des extraits d'organes et du sérum, en présence de cytase de lapin (injection à des jeunes poussins).

TABLEAU IV.

ORGANES	MOBILITÉ	RÉSULTATS
Foie.	Part. mobiles.	Infection assez grave.
Moelle osseuse.	Immobilés.	O
Ganglions.	Immobilés.	+ le 7 ^e jour.
Rate.	Immobilés.	Crise le 9 ^e jour.
Epiploon.	Immobilés.	+ le 6 ^e jour.
Sérum au 10 ^e .	Immobilés.	+ le 9 ^e jour (crise).
Complément.	Mobiles.	+ le 4 ^e jour.
Témoin.	Mobiles.	—

Quoique relativement rare, cette observation est précieuse, puisqu'elle montre que la moelle osseuse peut contenir des anticorps capables d'exercer leur action dans l'organisme vivant, à un moment où le sérum est inactif; elle prouve ainsi que le *tissu myéloïde est non seulement un dépôt, mais aussi une source de principes immunisants.*

D'ailleurs, il est aisé de s'apercevoir à la lecture de nos protocoles, qu'il n'existe nul rapport entre la richesse des divers

tissus en sang et leur teneur en sensibilisatrice spirillolytique. Ainsi, le foie est un organe dont la circulation capillaire est des plus développée et qui forme une sorte d'éponge d'où il est très difficile de retirer entièrement le liquide hématique. Or, le pouvoir immobilisant et microbicide de l'extrait de glande hépatique est nul, ou à peu près. D'autre part, on ne saurait trouver d'organe plus pauvre en sang que les ganglions lymphatiques et surtout l'épiploon, et cependant ces organes se sont montrés plus d'une fois actifs au cours de nos recherches. Enfin, l'objection dont nous avons parlé, tombe devant le fait que les extraits des organes leucopoïétiques contiennent la sensibilisatrice et non pas la cytase. Or, si le pouvoir immobilisant et bactériolytique de ces extraits était effectivement dû à leur teneur en sang, les deux principes constitutifs des immum-sera, la cytase et la sensibilisatrice, devraient exister simultanément dans les sucs de ces organes.

Force est donc d'admettre que les tissus dont la fonction principale est la production des globules blancs, sont à la fois une source active et un dépôt d'anticorps, et que les substances spécifiques des sérums immunisants proviennent de ces organes. Il y a lieu également de supposer que *les tissus leucopoïétiques déversent rapidement dans le plasma les anticorps qu'ils fabriquent* puisque le sérum sanguin acquiert, peu de temps après le début de l'immunisation, des qualités immobilisantes et thérapeutiques.

La question est de savoir laquelle des diverses espèces cellulaires qui entrent dans la constitution des organes hématopoïétiques, intervient d'une façon active dans la production des anticorps spirilliques. Il faut exclure le tissu conjonctif qui forme le stroma de ces organes, pour le motif que ce tissu est répandu d'une façon uniforme dans tout l'organisme et qu'il existe abondamment dans le foie et le rein, organes qui ne produisent pas d'anticorps. Restent les hématies et les globules blancs. Pour ce qui concerne la première de ces deux catégories de cellules, il y a lieu de remarquer qu'elle n'est pas représentée dans *tous* les tissus hématopoïétiques que nous avons étudiés. Ainsi, si la moelle osseuse produit un grand nombre de normoblastes, les ganglions lymphatiques et surtout la rate ne deviennent une source d'hématies nucléées,

chez les animaux adultes, que dans des conditions pathologiques exceptionnelles (Dominici). Par contre, les leucocytes forment la vraie base histologique de tous les tissus dont les extraits se sont montrés riches en anticorps. La moelle osseuse, comme il résulte des études d'Ehrlich¹ et de ses élèves, de Hirschfeld², de Naegeli³ etc., renferme toute la série de cellules blanches granuleuses, depuis le myéloblaste et le myélocyte, jusqu'au polynucléaire adulte du sang. Les ganglions sont, d'autre part, le lieu d'origine de la série lymphatique des globules blancs. Enfin, la rate, par ses follicules, engendre une partie des lymphocytes, et par cette intéressante propriété de retourner à l'état embryonnaire sous l'influence de certains agents infectieux, propriété entrevue par Arnold et bien étudiée par Dominici⁴, se rattache intimement aux organes producteurs de leucocytes granuleux.

L'épiploon occupe une place spéciale parmi les organes producteurs d'anticorps. Ce tissu n'est pas un formateur de globules blancs chez les animaux adultes, et le fait qu'il n'est pas moins une source d'anticorps (v. tabl. III, lap. n° 41), semble au premier abord venir à l'encontre de l'origine leucocytaire de ces anticorps. Pourtant, l'examen microscopique pratiqué dans les circonstances les plus variées, telles que l'injection intra-péritonéale d'hématies, de microbes ou d'albumines étrangères (Kraus et Levaditi), montre que si l'épiploon n'est pas une source de globules blancs, il n'en devient pas moins un dépôt important. En effet, les leucocytes qui peuplent la cavité péritonéale à la suite de ces injections, ne tardent pas à s'accumuler dans les mailles lymphatiques de cet épiploon, d'où le lavage ne réussit à les retirer qu'avec peine. Nous avons pu vérifier la réalité de ce fait chez nos lapins immunisés, dont l'épiploon était, peu de temps après l'introduction du sang spirillique dans le péritoine, farci de globules blancs polynucléaires et de macrophages.

Il résulte donc que le seul trait commun qui ressort de l'étude histologique des organes producteurs d'anticorps,

1. EHRLICH, *Die Anaëmie*, Pathol. de Nothnagel, Vienne 1900. Voir pour les détails, LEVADITI, *Le leucocyte et ses granulations*, Paris, Naud, 1902.

2. HIRSCHFELD, *Virch. Arch.*, vol. CLIII, 1898.

3. NÆGELI, *Deutsche med. Woch.*, n° 18, 1900.

4. DOMINICI, *Arch. de méd. expér.*, vol. XII, 1900.

est leur fonction leucopoïétique et la destinée qu'ils ont d'accumuler un grand nombre de globules blancs, d'être, pour ainsi dire, de vrais dépôts de leucocytes. D'où l'on doit conclure que *l'élément cellulaire qui représente dans ces organes la source principale de ces anticorps, n'est autre que le leucocyte.*

Ce qui, de plus, vient à l'appui de cette origine leucocytaire des anticorps, c'est la relation que l'on est forcé d'établir entre l'absorption des principes immunogènes (*antigènes* de Deutsch) et la formation de ces anticorps. La simple réflexion nous contraint d'admettre en effet, quelle qu'elle soit la théorie que l'on accepte, que la cellule qui produit l'anticorps doit être précisément celle qui absorbe la substance immunogène. Or, partout où on a analysé de près les procédés que l'organisme emploie pour résorber les corps immunisants solides (microbes ou cellules), on a reconnu que ces procédés relèvent de l'intervention des phagocytes. Ainsi, sans insister sur ce qui se passe dans la cavité péritonéale, où l'on voit les polynucléaires englober les microbes vivants ou morts, et les macrophages présider à la résorption des cellules, nous rappellerons seulement les processus de même ordre qui s'opèrent dans l'intimité des organes. Nous avons pu établir, par exemple, que l'injection d'hématies de pigeon dans la circulation générale du cobaye, est rapidement suivie de l'englobement de ces hématies par les macrophages de la rate, englobement qui peut être complet déjà au bout d'une heure¹. D'un autre côté, nous avons pu constater, pour ce qui concerne le cas particulier des spirilles, que ces microorganismes deviennent, chez la poule, la proie des phagocytes spléniques et médullaires pendant l'infection et au moment de la crise, constatation qui confirme les observations antérieures de Metchnikoff² et de Cantacuzène³. D'ailleurs, plus d'une fois on a vu ces spirochètes dans le protoplasma des leucocytes exsudés dans la cavité péritonéale et on a décrit leur involution progressive au sein de ce protoplasma (Metchnikoff, Sawtchenko).

Tout cela n'est pas sans prouver que les globules blancs doivent être considérés à juste raison, comme des éléments qui absorbent les principes immunogènes et qui élaborent des anticorps capables d'agir d'une façon élective sur ces principes.

1. LEVADITI, *Congrès intern. d'Hygiène de Bruxelles*, 1903.

2. METCHNIKOFF, *Virch. Arch.* vol. CIX, p. 476.

3. CANTACUZÈNE, *Ces Annales*, 1899.

Quelques objections ont été formulées contre cette manière de voir. Ainsi, M. A. Wassermann ayant constaté que les leucocytes puisés dans le sang et l'exsudat péritonéal des animaux immunisés contre le bacille typhique et le pneumocoque, à l'encontre des organes leucopoïétiques, ne possèdent nul pouvoir préventif, se refuse d'attribuer à ces leucocytes un rôle quelconque dans la fabrication des anticorps. Nous ne possédons pas d'expériences se rapportant à ce sujet. Néanmoins, si l'on compare les globules blancs de la circulation générale aux leucocytes qui n'ont pas encore quitté les appareils leucopoïétiques, on saisit certaines différences qui peuvent expliquer les résultats obtenus par M. Wassermann. Il y a tout d'abord la question d'âge; en effet, la série entière de leucocytes granulés jeunes, depuis le myéloblaste de Naegeli, jusqu'au myélocyte, n'abandonne jamais à l'état normal les tissus leucopoïétiques pour se répandre dans le système vasculaire. Ce système ne renferme que des globules blancs granulés ayant achevé leur entière évolution. Or, il n'est pas impossible que ces derniers se comportent d'une façon différente des globules blancs jeunes, au point de vue de l'élaboration ou de l'excrétion des anticorps.

D'un autre côté, les leucocytes de la circulation générale et des exsudats flottent librement dans le plasma et sont par conséquent, dans des conditions qui s'écartent sensiblement de celles où se trouvent les cellules blanches logées dans le système lymphopoïétique. Et, s'il est permis de formuler une hypothèse, on pourrait penser que dans le plasma sanguin, il existe des principes *excitosecréteurs*, de vraies *secrétines*, qui, en agissant sur les leucocytes circulants, provoquent une excrétion rapide et intégrale des anticorps élaborés et contenus dans ces leucocytes.

Une autre objection a été formulée par M. Pfeiffer, dans son rapport présenté au Congrès d'Hygiène de Bruxelles¹. Ce savant affirme que la présence des anticorps dans les organes hématopoïétiques n'est pas une preuve en faveur de l'origine leucocytaire de ces anticorps, pour le motif que ces organes ne fabriquent pas exclusivement des globules blancs, mais aussi du *plasma sanguin*.

Il est difficile de se rendre compte de la portée de cette objection, étant donné que l'origine du plasma hématique est des moins

1. R. PFEIFFER, *Rapport fait au Congrès intern. d'Hygiène de Bruxelles*, 1903.

précisée, toutes les cellules pouvant agir indifféremment sur ce plasma, qui est leur milieu liquide. Aucune donnée physiologique ne nous autorise, en effet, à admettre que la moelle osseuse, ou l'épiploon, par exemple, interviennent plus que le foie ou le rein, dans l'élaboration des principes constitutifs de ce plasma.

Les objections formulées par MM. Pfeiffer et Wassermann peuvent donc être facilement écartées, ce qui laisse sa pleine valeur à la conclusion que nous avons énoncée plus haut, à savoir que *le leucocyte est le principal producteur d'anticorps bactériolytiques.*

IV

Nos recherches, telles que nous les avons exposées jusqu'ici, présentent une lacune. Si ces recherches montrent que les leucocytes contenus dans les organes leucopoïétiques produisent les anticorps spirilliques, elles ne nous renseignent pas sur la manière dont les principes immunogènes, les spirilles, réussissent à atteindre ces organes, pour y provoquer l'élaboration de la sensibilisatrice. On avait admis jusqu'à présent que les spirilles introduits dans la cavité péritonéale des animaux réfractaires à la maladie y subissent une destruction intégrale grâce à l'intervention des phagocytes (Sawtchenko). Ils disparaissent au bout de peu de temps de cette cavité, sans que leur disparition soit précédée par l'arrêt de leurs mouvements. Dès lors, pour expliquer, la pénétration des spirochètes ou de leurs débris, dans des organes hématopoïétiques situés loin du péritoine, telle que la moelle osseuse par exemple, il fallait admettre que les leucocytes péritonéaux, chargés de spirilles ou de produits résultant de leur transformation, gagnaient ces organes par l'intermédiaire de la circulation sanguine ou lymphatique.

Nos constatations nous ont montré que l'invasion des spirilles dans le système hématopoïétique s'opère d'une toute autre façon. En effet, nous avons pu voir, soit à l'aide de l'inoculation des animaux sensibles, soit au moyen de l'examen microscopique, que *les spirilles introduits dans le péritoine du lapin, pénètrent activement dans la circulation générale et se répandent dans les organes, tout en conservant leur virulence.*

Expérience XII. — 2 lapins reçoivent dans la cavité péritonéale 15 c. c. de sang de poule, riche en spirilles. Ils sont sacrifiés par saignée à blanc, 24 et 48 heures après l'injection. Les organes servent à préparer des émulsions dans de l'eau salée à 8 0/00, émulsions que l'on injecte, en même temps que le sang défibriné et l'exsudat péritonéal, à des calfats (à la dose de 5 c. c.).

TABLEAU V

ORGANES	LAPIN 24 HEURES	LAPIN 48 HEURES
Foie:	+ le 3 ^e jour	O
Rate	+ le 3 ^e jour	O
Ganglions	+ le 8 ^e jour	O
Moelle osseuse	+ le 7 ^e jour	O
Epiploon	+ le 3 ^e jour	O
Exsudat	+ le 7 ^e jour	O
Sang	+ le 3 ^e jour	O

Il résulte de cette expérience, qu'au moins une partie des spirilles introduits dans le péritoine du lapin, apparaissent dans la circulation générale et pénètrent, au moyen de cette circulation, dans des organes situés plus ou moins loin de cette cavité. Il y a donc *une vraie spirillose du lapin*, constatation précieuse, puisqu'elle nous explique le mode suivant lequel l'agent antigène atteint, chez des animaux réputés réfractaires à la maladie, les tissus hématopoïétiques, pour provoquer une formation d'anticorps dans ces tissus. Pourtant, il ne semble pas qu'il s'agisse ici d'une multiplication intense des spirilles dans l'organisme du lapin. En effet, il nous a été impossible, en pratiquant des passages successifs de sang spirillique d'un lapin à l'autre, de réaliser une augmentation de la virulence et de provoquer une maladie mortelle, même chez les jeunes animaux. Généralement, le sang devient stérile au bout de 2 à 3 passages. Reste à savoir si en affaiblissant l'organisme des mammifères par des moyens toxiques ou infectueux, on n'arriverait pas à rendre pathogène pour ces mammifères, le spirille de Marchoux et Salimbeni. C'est là une question que nous nous réservons et qui fera le sujet d'une étude ultérieure.

*
* *

CONCLUSIONS

1. La formation des anticorps spirilliques a lieu, chez les organismes réfractaires à la septicémie brésilienne, dans les organes leucopoïétiques, en particulier dans la *rate*, la *moelle osseuse* et les *ganglions lymphatiques*.

Elle a lieu également dans l'*épiploon*, qui devient un dépôt de globules blancs chez les animaux inoculés dans la cavité péritonéale. *Les leucocytes doivent être considérés, par conséquent, comme la source principale, sinon exclusive, d'anticorps.*

2. La pénétration des spirilles dans les organes producteurs de principes immunisants, a lieu par l'intermédiaire de la circulation générale. Ces spirilles, introduits dans le péritoine du lapin, ne tardent pas à envahir cette circulation, d'où ils disparaissent au bout de peu de temps. La transmission des spirochètes d'un animal à l'autre, devient impossible au bout de 3 passages.

SUR L'EXISTENCE D'UN FIXATEUR DANS L'ORGANISME DE L'ANIMAL JOUISSANT DE L'IMMUNITÉ NATURELLE

Par M. PIERRE ZABOLOTNOFF (DE KASAN).

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff)

Malgré le nombre considérable de travaux consacrés à l'étude des facteurs qui jouent un rôle actif dans l'organisme animal jouissant de l'immunité naturelle, contre un microbe, la science n'a pas encore dit le dernier mot sur cette question, qui est envisagée de diverses façons.

Actuellement, deux théories principales sont en présence : d'un côté, la théorie cellulaire, développée et soutenue par M. Metchnikoff et ses élèves; d'autre part, la théorie humorale, dont Buchner, Pfeiffer et d'autres sont les défenseurs ardents.

D'après la théorie de M. Metchnikoff¹, chez les animaux jouissant de l'immunité naturelle, le rôle principal appartient à la phagocytose, au moyen de laquelle l'organisme détruit les microbes.

L'étude des propriétés bactéricides du sérum a amené Buchner à conclure que ces propriétés sont surtout intimement liées à la présence d'un certain principe, qu'il a nommé alexine.

D'autre part, en étudiant le phénomène de Pfeiffer, Bordet a démontré que 2 principes y jouent un rôle prépondérant; l'un est renfermé dans le sérum spécifique rendu inactif par chauffage à 56° et l'autre dans le sérum frais normal. Au pre-

1. METCHNIKOFF, *L'Immunité dans les maladies infectieuses*. Paris, 1901, p. 217.

mier, il donne le nom de substance sensibilisatrice, le second est précisément l'alexine de Buchner.

Ces 2 principes sont nécessaires pour produire la désaggrégation granuleuse des vibrions du choléra, phénomène connu sous le nom de phénomène de Pfeiffer.

Bordet et Gengou¹ ont découvert, au moyen d'un procédé spécial, la présence de substances sensibilisatrices ou fixateurs dans les sérums spécifiques.

Dans un de ses articles sur les phénomènes d'agglutination, Bordet² formule l'hypothèse de l'existence de propriétés communes aux sérums spécifiques et aux sérums normaux. Ceux-ci ne contiennent-ils pas en faibles proportions les mêmes principes actifs qui se développent dans les sérums spécifiques fournis par les animaux immunisés contre les microbes ? Ainsi, en combinant l'action de 2 sérums normaux sur les vibrions cholériques, il est possible de constater leur transformation granuleuse.

Il en est de même, si l'on ajoute à la culture de vibrions du sérum frais de cobaye à une certaine quantité de sérum normal de cheval chauffé. Autrement dit, il pourrait exister une substance sensibilisatrice ou fixateur dans le sérum normal de cheval.

Cependant, Bordet ne se prononce pas définitivement.

Pfeiffer³ avait fait antérieurement la même observation sur le sérum chauffé de chèvre. Wechsberg⁴ a démontré la présence du fixateur du bacille typhique dans le sérum normal de lapin.

Malvoz⁵ a découvert dans le sérum normal de chien la présence du fixateur du bacille du charbon, en se servant de la méthode de Bordet et Gengou. Le sérum de chien se comportait exactement comme le sérum d'un cobaye ayant reçu de la bactériodie charbonneuse.

1. BORDET ET GENGOU, Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1904, n° 5.

2. BORDET, Agglutination et dissolution des globules rouges par le sérum. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1899, p. 273.

3. PFEIFFER, Weitere Mittheilungen über die specifischen Antikörper der Cholera, *Zeitschr. f. Hygiene, und Infektionskrankheiten*. Bd. XX.

4. WECHSBERG, Zur Lehre von der natürlichen Immunität und über bactericide Heilsera. *Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskrankheiten*. Bd. XXXIX, s. 469.

5. MALVOZ, Contribution à l'étude des fixateurs du sérum normal de chien. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902.

Les expériences de Bail¹ et Petterson² confirment les observations de Malvoz. Il suppose un certain rapport entre la sensibilité de l'animal au charbon et la présence ou l'absence des fixateurs du bacille du charbon dans le sérum.

Il est nécessaire de poursuivre la question dans la même voie afin de juger si le phénomène est général. Les observations faites jusqu'à présent ne résolvent pas le problème, étant donné leur caractère isolé.

Pour éclaircir la question de la préexistence des fixateurs dans l'organisme animal jouissant de l'immunité naturelle contre les microbes, je me suis servi de cobayes, animaux tout à fait réfractaires au bacille du rouget des porcs.

*
* *

Dans mes recherches de l'existence d'un fixateur dans le sérum normal de cobaye, j'ai utilisé la méthode de Bordet et Gengou. Pour avoir à ma disposition une quantité suffisante de microbes du rouget des porcs, j'ajoutais au bouillon ordinaire le tiers de son volume de sérum de porc. Avant de commencer l'expérience, les microbes étaient séparés du milieu de culture par centrifugation et lavés dans l'eau physiologique. Je préparais une émulsion de bacilles dans l'eau physiologique de façon qu'elle ait un aspect laiteux.

Le sérum de porc animal, très sensible au microbe en question, et l'eau physiologique servaient pour le contrôle.

On préparait plusieurs tubes à essai contenant les mélanges suivants :

Le 1^{er} renfermait de l'alexine (sérum frais de cobaye), de l'émulsion de bacilles et du sérum chauffé de cobaye.

Dans le 2^e, le sérum de cobaye était remplacé par le sérum de porc.

Dans le 3^e, le sérum était remplacé par l'eau physiologique.

1. BAIL, Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität. *Centralblatt für Bakteriologie*, Bd. XXXIII, s. 610.

2. PETTERSON, Ueber die natürliche Milzbrandimmunität des Hundes und des Huhns. *Centralbl. f. Bakteriologie*, Bd. XXXIII, s. 613.

Le 4^e ne contenait que de l'alexine et de l'eau physiologique.

Ainsi, 4 tubes à essais servaient à l'expérience : 3 contenaient l'émulsion de bacilles, le 4^e n'en contenait pas.

Moins de 1/2 heure après l'addition des globules rouges sensibilisés de lapin, dans le tube qui ne contenait que l'eau physiologique et l'alexine l'hémolyse était complète. Évidemment, la quantité d'alexine était suffisante pour produire une hémolyse complète, car tous les globules étaient décolorés et on n'apercevait au fond du tube que des stromas incolores. Cependant les choses se passaient autrement dans le tube contenant l'émulsion de bacilles. Au bout d'une demi-heure ou de 1 heure après l'addition des globules sensibilisés, l'hémolyse complète n'avait pas lieu ; on remarquait dans tous les tubes une coloration faible, dont l'intensité n'augmentait qu'après quelques heures.

Quoique loin d'être complète, l'hémolyse était plus nettement caractérisée dans le premier et dans le second tube à essai, qui contenaient du sérum chauffé de cobaye et du sérum de porc, ce qui semblait indiquer la présence d'un fixateur dans les sérums employés.

Mais contre cette conclusion s'élève le fait que dans le tube où le sérum est remplacé par l'eau physiologique, l'hémolyse se fait aussi.

La présence des bactéries est donc par elle-même un obstacle à l'hémolyse complète, en dehors d'une influence quelconque du sérum chauffé de cobaye ou de porc. Il y a eu ici absorption d'alexine par les bacilles, sans qu'un fixateur ait joué le rôle d'élément intermédiaire.

En analysant cette expérience, nous voyons que la quantité d'alexine était parfaitement suffisante pour hémolyser complètement les globules rouges ajoutés. Mais cette dose d'alexine ne suffit plus à déterminer l'hémolyse complète en présence de l'émulsion des bacilles.

Pour obtenir l'hémolyse complète en présence des bacilles, sans augmenter la dose d'alexine, on peut diminuer la quantité des bacilles ou bien augmenter la quantité d'alexine sans diminuer la masse des bacilles, ou bien encore, tout en augmentant la dose d'alexine, on peut prendre une émulsion moins épaisse.

Une autre expérience a été faite dans les mêmes conditions que la précédente, avec cette différence que l'émulsion des bacilles était moins épaisse et avait été additionnée de différentes doses d'alexine : 2 c. c. ; 4 c. c. ; 6 c. c. On préparait avec chacun de ces mélanges 3 tubes à essai : avec le sérum de cobaye, le sérum de porc et l'eau physiologique.

Le résultat de la seconde expérience a été quelque peu différent. En premier lieu, la marche de l'hémolyse a été parallèle dans tous les tubes, aussi bien avec le sérum de cobaye ou le sérum de porc, qu'avec l'eau physiologique.

Le tube contenant 2 c. c. d'alexine donnait une coloration nette, mais une partie des globules reste intacte ; avec 4 c. c. d'alexine, l'hémolyse était presque complète, car, au fond, on voyait à peine quelques globules encore colorés. Mais, 3 heures après, leur hémoglobine est dissoute ; enfin, avec 6 c. c. d'alexine, l'hémolyse complète survenait rapidement.

L'expérience répétée donna chaque fois un résultat identique.

Quelle conclusion peut-on en tirer ?

Si le fixateur était réellement contenu dans le sérum du cobaye, l'hémolyse n'aurait pas lieu, ou bien elle serait plus faible que dans les tubes de contrôle. Dans ce cas, l'alexine se serait fixée sur les microbes sensibilisés.

Mais, dans notre expérience, l'hémolyse nette a lieu dans tous les tubes, aussi bien avec le sérum de cobaye ou le sérum de porc, qu'avec l'eau physiologique.

Ainsi, nous devons conclure que le sérum normal de cobaye, qui est un animal naturellement réfractaire au microbe du rouget des porcs, ne contient pas de fixateur vis-à-vis de ce microbe.



On ne saurait donc généraliser l'idée exprimée par Malvoz, à savoir qu'il existe un rapport entre l'immunité naturelle de l'animal et la présence dans son organisme de fixateurs spécifiques. Dans le cas actuel cette idée ne se confirme pas.

La manière dont l'organisme animal résiste au microbe du

rouget a été étudiée par M. Metchnikoff¹ sur les lapins et par M. Mesnil² sur les souris. Le premier a démontré que dans l'organisme du lapin, peu sensible à ce microbe, les bacilles sont détruits uniquement par les phagocytes.

M. Mesnil a également étudié la phagocytose sur les souris : il inoculait les unes avec la culture des bacilles, les autres étaient traitées en même temps avec le sérum préventif de lapin immunisé, il observa la phagocytose chez les unes et les autres, avec cette différence que chez les souris ayant reçu le sérum préventif, la phagocytose était beaucoup plus rapide et que les bacilles étaient englobés dans un temps relativement très court.

J'ai encore refait la même expérience avec les cobayes pour étudier sur eux la phagocytose.

On introduisait dans la cavité abdominale de 1 c. c. à 1,5 c. c. de culture pure. Deux heures après l'injection de la culture, dans l'exsudat recueilli, on trouvait un petit nombre de leucocytes renfermant quelques bacilles. La plus grande partie des bactéries se trouvaient libres dans l'exsudat. 3 heures après, la quantité de bactéries englobées était plus grande. L'exsudat recueilli au bout de 6 à 7 heures ne contient presque plus de microbes en liberté; l'immense majorité est englobée par les leucocytes, surtout par les polynucléaires, dont quelques-uns sont remplis de bacilles. Dans certains leucocytes, à côté des bactéries nettement colorées, on peut rencontrer des bacilles à peine colorées d'un brun rougeâtre. L'exsudat recueilli au bout de 10 heures diffère en ce que dans certains leucocytes les bactéries prennent un aspect granuleux plus ou moins prononcé. L'exsudat recueilli au bout de 22 heures 1/2 est assez riche en cellules. Quoique les polynucléaires constituent la plus grande partie des éléments cellulaires, les bactéries ne s'y trouvent qu'en nombre limité. Elles se trouvent au contraire renfermées dans les mononucléaires. Il est à remarquer aussi que ces derniers ont visiblement augmenté de volume et contiennent dans leur intérieur de 1 à 4 polynucléaires, sans compter les globules rouges. Les bacilles sont rassemblés en une masse unique, ou en 2 ou 3 masses sépa-

1. METCHNIKOFF, Étude sur immunité, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1889.

2. MESNIL, Sur le mode d'action du sérum préventif contre le rouget des porcs. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898.

rées. Il est même souvent impossible de distinguer les bacilles individuellement, car ils se présentent comme un amas granuleux.

Cela est encore plus visible quand on fait des préparations avec de l'exsudat recueilli 30 heures après l'inoculation. Ici la masse des bacilles est complètement transformée en grains moins nombreux déjà que dans les préparations précédentes.

Pour déterminer à quel point sont virulents les bacilles ainsi englobés et savoir au bout de combien de temps ils sont digérés à l'intérieur des leucocytes, on inocula l'exsudat à des souris. La souris à laquelle on avait inoculé l'exsudat recueilli au bout de 3 heures succomba en 4 jours. 2 autres souris, qui avaient reçu, l'une, l'exsudat recueilli au bout de 7 heures, et l'autre, l'exsudat recueilli au bout de 10 heures, succombèrent au bout du 5^e jour.

Les faits observés nous permettent de conclure que la préservation de l'organisme du cobaye a lieu au moyen de la phagocytose, qui est déjà évidente au bout de 3 heures et très nettement caractérisée au bout de 7 heures. A ce moment, la réaction phagocytaire est complète, car l'exsudat ne contient plus de bactéries en liberté.

Pendant les premières 10 heures, les agents de la destruction des microbes sont les leucocytes polynucléaires, et ensuite apparaissent les mononucléaires, qui achèvent la digestion des bactéries.

Dans quel état les bactéries étaient-elles englobées par les leucocytes : étaient-elles mortes ou vivantes ? Il est évident qu'elles étaient vivantes et virulentes puisque l'exsudat recueilli après 7 à 10 heures, alors que tous les bacilles sont englobés, tue les souris auxquelles il est inoculé.

Nous pouvons conclure que :

1^o Le sérum de cobaye ne contient pas de fixateur spécifique vis-à-vis du bacille du rouget des porcs ;

2^o La protection de l'organisme de cet animal contre le micro-organisme en question se fait uniquement par voie de phagocytose.

Je suis heureux d'exprimer ma profonde reconnaissance à

mon illustre maître M. le professeur Metchnikoff et au docteur Besredka, pour leurs excellents conseils, qui m'ont aidé à achever le présent travail.

Sur l'isolement de la zymase des végétaux

ET DES TISSUS ANIMAUX

REVUE CRITIQUE

- Mémoire 1. — JULIUS STOKLASA et F. CERNY, *Berich. d. d., Chemis. Gesell.*, t. XXXVI, n° 3, 1903.
- 2. — JULIUS STOKLASA. Communication, V^e Congrès de Chim. appl. Berlin, juin 1903.
- 2. — JULIUS STOKLASA et CERNY, *Centralb. f. Physiol.*, t. XVI, n° 23.
- 4. — JULIUS STOKLASA, J. JELINEK et F. CERNY, *Central. f. Phys.*, t. XVI, n° 25.
- 5. — EUG. SIMACZEK, *Central. f. Phys.*, t. XVII, n° 1.
- 6. — — — — — t. XVII, n° 8.
- 7. — JULIUS STOKLASA und CERNY, *Berichte d. d. Chemis. Gesell.*, t. XXXVI, n° 16.
- 8. — JULIUS STOKLASA, *Central. f. Phys.*, t. XVII, n° 17.
- 9. — J. S. *Deutsche, Med. Wochen.*, 1904, n° 6.
- 10. — J. STOKLASA. *Archiv. f. de Gesamm. Physiol.*, t. CI, p. 311.

La diastase qui dédouble les hexoses en deux molécules d'alcool et deux molécules d'anhydride carbonique, admise par Berthelot et Claude Bernard, recherchée sans succès par Pasteur, a été isolée de la levure en 1897 par Buchner qui lui a donné le nom de zymase.

J'ai montré la place qu'elle occupe parmi les diastases digestives : elle prend une part prépondérante à l'assimilation des sucres. J'ai établi aussi qu'elle se forme dans les conditions de vie normale, c'est-à-dire au contact de l'air ou à l'abri de l'oxygène suivant que la cellule qui la produit est aérobie ou anaérobie. On ne peut pas l'isoler facilement de toutes les cellules vivantes ; mais elle traduit le plus souvent sa présence par son action sur les sucres à l'abri de l'air. En particulier, s'il est difficile de la mettre en évidence chez les végétaux supérieurs, un séjour plus ou moins long à l'abri de l'oxygène la fait apparaître. La fermentation qui se déclare dans ces conditions se présente comme un fait isolé, inexplicable parce qu'il ne semble pas se rattacher aux fonctions normales de la cellule ; mais si on considère que la production de zymase se présente comme un phénomène de régénération de la diastase plus ou moins altérée, on a là une preuve de sa présence en vie normale¹.

Il y a encore un moyen plus direct de le montrer, c'est de l'isoler. MM. Stoklasa et ses collaborateurs prétendent y être parvenus. Leurs essais ont porté, sur des végétaux préalablement privés d'air par submersion, en présence d'une atmosphère d'hydrogène, pendant un temps assez long pour permettre à la zymase de se former, sur des végétaux frais, sur des tissus animaux encore tièdes.

Leurs résultats appuyés par un grand nombre de chiffres ont paru dans une série de mémoires publiés dans divers journaux.

Pour isoler la zymase, M. Stoklasa et ses collaborateurs ont employé un procédé qui tient à la fois de la méthode de Buchner (broyage des matériaux et extraction du suc par pression) et de celle d'Albert (traitement du jus par un mélange d'alcool et d'éther).

Les végétaux ou les tissus animaux, finement broyés avec du sable fin et anguleux, sont soumis au moyen d'une presse hydraulique à une pression de 250 à 300 at. Le jus est aussitôt traité par un mélange d'alcool et d'éther dans de longues éprouvettes à pied. Quand le précipité s'est déposé à peu près, on décante le mélange éthéro-alcoolique et on lave rapidement à l'éther seul, toujours par décantation, pour chasser le plus vite possible l'alcool qui altère rapidement la zymase. On essore enfin à la trompe et on sèche dans un courant d'air à 30° ou dans le vide sulfurique.

Le précipité séché de cette façon est réduit en poudre et introduit dans une solution de glucose à 150/0, à raison de 10 grammes environ par 100 c. c. de solution.

Comme antiseptique, les auteurs ont employé du sublimé à 0,01 0/0; du toluène à 1 0/0 et du thymol à 0,4 0/0. Ces préparations sont mises à fermenter à une température de 28-30°, lorsqu'elles sont faites avec des organes végétaux, et à 38-40° si elles sont obtenues en partant des tissus animaux. Lorsqu'on mélange la poudre diastasifère sèche avec la solution sucrée, on observe une fermentation immédiate et parfois tumultueuse.

Mais toutes ces opérations demandent à être faites très rapidement pour aboutir à un succès certain.

Dans le tableau suivant, j'ai réuni les chiffres les plus élevés que M. Stoklasa et ses collaborateurs ont obtenus avec les zymases qu'ils ont tirées de divers végétaux après les avoir maintenus pendant un temps plus ou moins long à l'abri de l'air.

	CO ₂ dégagé grammes.	Alcool produit. grammes.
Racines de betteraves.....	1,25	4,37
Pommes de terre.....	0,88	0,79
Pois (graines).....	0,387	0,427

Les végétaux frais et les tissus animaux encore tièdes traités de la même façon conduisent aux mêmes résultats.

Voici quelques-uns des chiffres obtenus :

	CO ² dégagé, grammes.	Alcool produit. grammes.
Plantules de pois de 20 jours.	0,384	0,423
Racines de betteraves.	0,45	0,54
Viande de bœuf.	1,01	1,16
— — — — —	1,38	1,45
Poumons de bœuf.	3,088	3,201

Ces chiffres sont empruntés au mémoire n° 1. Ils semblent parfaitement concluants et montrent que la zymase existe dans les végétaux, dans les tissus animaux, aussi bien à l'état frais qu'après une privation plus ou moins prolongée d'oxygène.

Mais M. Stoklasa et ses collaborateurs sont revenus depuis sur ces résultats, et ils n'ont pas gagné en assurance.

La fermentation n'est pas, en effet, toujours immédiate ; mais elle se déclare cependant dans les 6 à 12 heures qui suivent l'introduction de l'extrait sec et pulvérisé dans les solutions sucrées, à la température de 30° ou de 40° suivant l'origine de la diastase ; et c'est toujours à la zymase qu'il faut l'attribuer.

Une autre préoccupation très importante aussi se traduit déjà dans le mémoire n° 2. Malgré l'emploi d'antiseptiques, il y a des ferments dans les solutions sucrées, à la fin de l'expérience ; ils ont été isolés, cultivés à part dans des milieux sucrés et on a constaté qu'ils ne produisent pas de fermentation alcoolique. On n'a d'ailleurs trouvé que trois espèces microbiennes : le *bacillus coli*, le *bacillus subtilis* et un *bacillus fluorescens*.

Les quantités d'acide carbonique qu'ils dégagent sont, du reste, insignifiantes ; elles atteignent en moyenne 0,008 à 0,024 gramme au bout de 36 heures à 38° en présence de thymol ; mélangées ensemble, les trois espèces en dégagent 0,0028 à 0,007 gramme pendant le même temps ; il n'y a donc pas de fermentation.

D'ailleurs, si on opère avec beaucoup de précaution, après avoir stérilisé les récipients, les solutions de glucose, etc., les solutions sucrées additionnées de poudre diastasifère peuvent rester pures de microbes pendant toute la durée de l'expérience ; on ne trouve pas non plus de ferments anaérobies.

La méthode d'isolement de la zymase, sur laquelle les auteurs ont été sobres de détails dans le mémoire n° 1, se précise par la suite en se modifiant toutefois.

C'est ainsi que les quantités d'alcool et d'éther qui servent à préci-

piter les sucs obtenus par pression s'emploient dans les proportions suivantes pour les végétaux :

Suc.....	500 c. c.
Alcool.....	400 —
Éther.....	200 —

Le suc obtenu en partant de tissus animaux est traité par le mélange suivant :

Suc.....	300 c. c.
Alcool.....	350 —
Éther.....	300 —

Enfin on s'est arrêté définitivement aux proportions suivantes :

Suc.....	300 c. c.
Alcool.....	500 —
Éther.....	500 —

La dessiccation du précipité se faisait dans un courant d'air chaud à 30° (mémoire n° 1); ce procédé a été abandonné par la suite et remplacé par le vide sulfurique.

Malgré toutes les précautions, les perfectionnements, les résultats les plus récents restent beaucoup moins probants que ceux du mémoire n° 1, si bien que l'on devient un peu sceptique lorsque les auteurs viennent affirmer qu'ils ont démontré également la présence, dans les cellules végétales et animales, de la diastase lactique qui dédouble le sucre en deux molécules d'acide lactique et lorsqu'ils signalent la présence de l'acide acétique et quelquefois de l'acide butyrique parmi les produits de fermentations diastasiques. Il devient évident qu'on se trouve là en présence des produits de fermentations microbiennes, et si ce fait a échappé à M. Stoklasa et à ses collaborateurs, c'est parce qu'ils ont négligé de pousser assez loin leurs investigations ou qu'ils ont employé des milieux de culture impropres à cette démonstration.

Ils signalent encore d'autres faits assez inexplicables; tel l'inactivité du jus entier qui sort de la presse. Ce jus ne renferme pas de zymase; tout au plus a-t-il un pouvoir glycolitique faible; mais l'extrait qu'on en retire par le procédé indiqué renferme de la zymase. C'est certainement la première fois qu'on signale un fait de cet ordre; et il semble assez curieux que l'alcool et l'éther qui atténuent l'activité de toutes les diastases y compris la zymase de la levure et de l'*Eurotiosis Gayoni*, fassent naître cette zymase des végétaux et des cellules animales dans un milieu qui n'en renferme pas. On retrouvera la raison de cette anomalie plus loin. Il s'agit maintenant de discuter les résultats que j'ai rappelés brièvement.

Si on considère, dans la série des mémoires, les appréciations émi-

ses sur la marche de la fermentation, on constate qu'elle est toujours immédiate et parfois tumultueuse, (mémoire n° 1); cela veut dire qu'elle se déclare dès que le mélange de la poudre diastasifère avec la solution sucrée est opéré. Si cette observation est juste, c'est assurément la meilleure preuve que l'on puisse donner de l'existence de la zymase; mais cette affirmation est rectifiée dans le mémoire n° 2; la fermentation est immédiate ou tout au moins se déclare dans les 12 heures; mais c'est toujours la zymase qui agit. Alors, on ne s'explique pas qu'elle soit restée 12 heures inactive à 38° pour se réveiller ensuite et produire une fermentation qui devient bientôt tumultueuse et forme une épaisseur de plusieurs centimètres de mousse persistante.

Quand elle est immédiate, on ne comprend pas non plus qu'au bout de 24 ou 48 heures on ne trouve que 200 c. c. environ de CO² dégagé.

Voici, en effet les, chiffres fournis par deux expériences faites sur des graines de pois, mémoire n° 1.

	Durée de la fermentation. Heures.	CO ² dégagé. Grammes.	Alcool formé. Grammes.
Expérience I.	24	0,396	0,409
Expérience II.	48	0,387	0,427

Une fermentation immédiate, se déclarant dans 100 c. c. de liquide, met en liberté, au bout d'une heure, plus de 200 c. c. de CO². Le liquide doit être en effet sursaturé de gaz avant qu'il puisse se former des bulles de CO². Le coefficient de solubilité est alors voisin de 2, et comme il s'en perd par diffusion et par dégagement direct de bulles gazeuses dès que la fermentation devient visible, il faut bien admettre qu'une fermentation aussi rapide se déclarant dans 100 c. c. de liquide dégage bien près de 200 c. c. de CO² au bout d'une heure; on ne comprend donc pas qu'il ne s'en forme pas davantage au bout de 24 ou 48 heures.

Les auteurs ont fait usage d'antiseptiques; ils ont employé du sublimé à 0,01 0/0; du toluène à 1 0/0 ou du thymol à 0,4 0/0. — Le sublimé introduit à cette dose dans une liqueur qui renferme 10 grammes de matières protéiques est immédiatement éliminé par précipitation; il devient donc à peu près inactif; le toluène est un antiseptique faible et le thymol n'a pas d'action sensible à la température de 38-40°; c'est cependant à ce dernier que M. Stoklasa a eu recours de préférence aux autres.

Les renseignements que l'on possède déjà sur la zymase de la levure, de l'Eurotiopsis, permettent de prévoir que l'isolement de cette diastase est une opération difficile, lorsqu'on s'adresse aux végétaux supérieurs et aux tissus animaux qui sont très pauvres en zymase.

On peut admettre que la levure employée dans ce but telle qu'elle sort de la brasserie peut décomposer en moyenne 10 fois son poids

de sucre en 24 heures à la température ordinaire; 1 kilogramme de levure fraîche a fourni à M. Buchner 500 c. c. de jus qui décompose 80 grammes de sucre en 24 heures. Le rendement en zymase par le procédé de Buchner est donc à peu près 1/120. L'Eurotiopsis dédouble son poids de sucre en 24 heures; lorsqu'on traite le mycélium par le mélange éthéro-alcoolique. (alcool absolu 3 p., éther rectifié 1 p.), il ne conserve que le 1/12 de son activité initiale; le jus obtenu par pression à 500 atmosphères, ne possède non plus que 1/12 environ de l'activité du mycélium normal. Si on admet, ce qui est tout à fait rationnel, que la zymase des végétaux supérieurs se détruit dans les mêmes proportions que celle de la levure ou de l'Eurotiopsis lorsqu'elle est soumise au même traitement, on peut prévoir que la quantité de zymase que l'on peut extraire des plantes ou des graines doit être extrêmement faible. J'ai constaté en effet que les graines de pois dédoublent à peu près le 1/100 de leur poids de sucre en 24 heures à la température de 22-25°. Il faut donc employer 100 grammes de graines pour obtenir 0^{sr}. 5 d'alcool en 24 heures; comme la perte de zymase pendant l'isolement est d'environ 11/12, c'est 1200 grammes de graines qu'il faut épuiser pour obtenir 0^{sr}. 5 d'alcool en 24 heures; et comme le jus entraîne 15 0, 0 de substances sèches de la graine, les 1,200 grammes de graines fournissent 180 grammes de précipité environ; 10 grammes de précipité produisent donc 25 c. c. de CO² à peu près en 24 heures. Si on remarque en outre que le procédé d'isolement employé par M. Stoklasa double les causes de destruction de la zymase, on ne peut pas s'attendre à observer, dans les conditions où les auteurs se sont placés, une fermentation immédiate et parfois tumultueuse.

Voilà ce que l'examen des faits connus permet de prévoir; mais il se peut que la zymase des végétaux supérieurs ou des animaux soit plus résistante que celle de la levure ou de l'Eurotiopsis; l'expérience ne justifiera pas cette supposition.

A côté de ces critiques d'ordre général, on peut encore relever dans les recherches de M. Stoklasa et de ses collaborateurs, quelques points de détail qui méritent d'être signalés, par exemple: lorsqu'ils opèrent dans des conditions d'*asepsie absolue* ils ne trouvent pas de microbes dans les solutions qui ont fermenté. On peut stériliser les récipients et les solutions sucrées qui doivent recevoir la poudre diastasifère; mais le suc cellulaire et le précipité qu'on en retire ne peuvent être traités, transvasés, séchés, pesés et introduits en dernier lieu dans les solutions, sans qu'on puisse éviter les germes qui sont en suspension dans l'atmosphère du laboratoire; les conditions d'*asepsie absolue* sont donc loin d'être réalisées.

Il est enfin utile de faire remarquer que le *bacillus coli* forme, aux

dépens du sucre, de l'alcool, de l'acide lactique, de l'acide acétique, du CO^2 et de l'hydrogène, contrairement à l'opinion formulée par M. Stoklasa.

Il résulte de tous ces faits que les auteurs se sont trouvés en présence de fermentations microbiennes et qu'ils ont négligé d'en rechercher les preuves. Il ne suffit pas, en effet, d'isoler quelques espèces et de constater qu'elles ne font pas fermenter les sucres; il faut s'assurer qu'à côté d'elles il n'y en a pas d'autres qui sont plus actives quoique plus difficiles à isoler. Le nombre des espèces qu'on n'a pas encore réussi à cultiver est assez grand pour ne jamais les perdre de vue.

Il est donc nécessaire de rechercher si aucun produit de fermentation ne peut être attribué exclusivement à une action microbienne.

Il est en outre indispensable de déterminer rigoureusement le moment précis où le dégagement de gaz commence; lorsque le début de la fermentation ne peut être constaté qu'après 42 heures de séjour à la température de 38° on ne saurait l'attribuer à l'action de la zymase libre, car la marche du phénomène ne reproduit nullement les caractères d'une action diastasique; celle-ci atteint son maximum dès que la température des solutions s'est mise en équilibre avec celle du milieu ambiant, et à partir de ce moment elle décroît graduellement jusqu'à zéro.

Pour fixer l'instant exact où le dégagement commence, il y a un moyen bien simple, c'est de faire le vide dans les récipients où l'on a introduit les solutions diastasiques et de les munir d'un tube manométrique à mercure. Les premières traces de gaz mises en liberté font baisser la colonne mercurielle.

Comme le tube manométrique n'est autre chose qu'un tube de dégagement, le même dispositif permet de recueillir sous le mercure les premières bulles de gaz qui se dégagent pour en faire l'analyse; car il ne faut pas oublier que les espèces microbiennes qui peuplent les milieux sucrés dégagent pour la plupart du CO^2 et de l'hydrogène.

Voilà donc les deux points importants qui permettent à mon avis de s'assurer si on se trouve en présence de fermentations microbiennes; c'est pour cela que je leur ai prêté la plus grande attention dans mes essais.

Les résultats que j'ai publiés dans ces *Annales*, p. 378-384, ont été obtenus pour la plupart au mois de juin 1903. A cette époque, les auteurs n'avaient encore publié qu'un mémoire; comme les procédés d'isolement ont varié depuis, j'ai repris tout récemment ces essais avec des poumons de bœuf encore tièdes.

Le jus extrait par la presse a été divisé en deux portions, la portion

A est celle qui passe entre 0 et 250 atmosphères; la portion B s'écoule entre 250 et 400 atmosphères.

Ces deux portions ont été traitées séparément et simultanément; les précipités secs qu'elles ont fournis ont été répartis par fractions de 10 grammes dans des ballons de 150-200 c. c. qui recevaient ensuite 100 c. c. de solution de glucose à 15 0/0.

Les essais ont donc porté :

I. — 1^o Sur les jus entiers A et B tels qu'ils sortent de la presse; 2^o sur les précipités qu'ils ont fournis, additionnés ou non d'antiseptiques dans les proportions suivantes :

II. — Toluène à 1 0/0 A et B.

III. — Thymol à 0,4 0/0 A et B.

IV. — Témoins sans antiseptique A et B.

Les jus entiers étaient additionnés de 15 0/0 de glucose mais les ballons qui les contenaient n'avaient pas été stérilisés, et on n'avait pris aucune précaution contre l'intervention des microbes. Les solutions sucrées, séries II, III et IV, avaient été au contraire préalablement stérilisées, ainsi que les ballons qui les avaient reçues.

Les résultats fournis par ces expériences à la température de 38° correspondent assez bien à ceux que M. Stoklasa et ses collaborateurs ont obtenus : les voici brièvement résumés :

1. — Le dégagement de gaz ne se manifeste dans aucun ballon avant 10 heures de séjour à 38°.

2. — Il commence dans les séries III et IV à peu près en même temps; dans toutes les autres il est en retard de plusieurs heures sur ces deux séries. Très lent au début, il augmente peu à peu pour atteindre son maximum au bout de 5 à 6 heures, c'est-à-dire après un séjour de 16 heures à 38°. On a recueilli dans ces conditions jusqu'à 100 c. c. de gaz par heure; mais le dégagement se ralentit après 24 heures assez rapidement.

3. — Le thymol ne gêne pas la fermentation; le précipité A est aussi actif que le précipité B, dans les séries III et IV; le toluène retarde et gêne la fermentation; son action est plus sensible sur le précipité B que sur le précipité A; le niveau du mercure baisse de 10 centimètres bout de 48 heures dans le ballon qui a reçu le premier et de 50 dans le second. Les jus entiers de la série I ne donnent non plus qu'un dégagement insignifiant; le jus B est encore moins actif que le jus A.

4. — Le mélange gazeux qu'on recueille sous le mercure renferme du CO² et de l'hydrogène, en proportions à peu près égales; le gaz carbonique devrait être en excès si la liqueur n'en retenait à l'état dissous.

5. — Les produits qu'on retrouve à la fin de l'expérience sont l'alcool, l'acide lactique, l'acide acétique.

6. Si on examine au microscope le contenu des ballons, on constate partout la présence des microbes; on en a isolé un certain nombre d'espèces qui donnent lieu à des fermentations très actives dans les milieux sucrés et forment tous les produits signalés plus haut.

Parmi ces résultats, il faut remarquer surtout ceux qui ont été fournis par les jus entiers; ces jus semblent offrir une résistance assez grande aux invasions microbiennes; et c'est à cette particularité qu'il faut attribuer l'inactivité que lui ont reconnue les auteurs.

S'il ne renferme pas de zymase, on ne comprend plus que le précipité qu'on en retire par l'addition d'alcool et d'éther, introduit dans une solution sucrée, donne naissance à une fermentation alcoolique. Le fait s'expliquerait jusqu'à un certain point si le suc cellulaire était pauvre en extrait, car l'addition de 10 grammes de précipité à la solution sucrée fournirait un milieu beaucoup plus riche en zymase que le jus entier si toutefois les réactifs n'en détruisaient pas; mais il n'en va pas ainsi; le suc cellulaire fourni par les tissus animaux ou par les graines, est riche en extrait; ainsi :

100 c. c. du jus A	fournissent	11,86	grammes de précipité.
100 c. c. — B	—	8,7	—

De sorte qu'en introduisant 100 grammes de poudre sèche dans 100 c. c. de solution sucrée, on réalise à peu près la concentration initiale; et le mélange ainsi obtenu ne diffère du jus normal qu'en ce que le précipité, réduit en poudre fine, ne se dissout pas bien et ne reste pas en suspension dans la liqueur; il faut remarquer en outre que l'action de l'alcool-éther ne peut qu'altérer ou détruire les diastases du jus normal et probablement aussi les traces de zymase qu'il peut renfermer.

J'ai enfin isolé, en collaboration avec M. Perrier, des solutions soumises à l'expérience, un certain nombre d'espèces microbiennes qui sont des ferments alcooliques actifs, surtout lorsqu'on les cultive à l'abri de l'air. Ils sont en même temps des agents de combustion, car ils décomposent l'eau en mettant de l'hydrogène en liberté. La quantité de CO_2 qu'ils dégagent est supérieure au chiffre théorique qui correspond à l'alcool trouvé dans le liquide de culture.

Les résultats de M. Stoklasa sont en grande partie d'accord avec cette constatation (mémoire 2); les auteurs en font d'ailleurs la remarque. La concordance aurait été encore plus grande, s'ils s'étaient servi d'appareils moins compliqués qui diminuent les causes d'erreurs.

A côté de l'alcool, ces ferments produisent encore, aux dépens du sucre, de l'acide lactique et de l'acide acétique.

Les propriétés de ces ferments les rapprochent par conséquent des ferments lactiques, et il est intéressant de faire cette constatation si

l'on remarque que les milieux constitués par le mélange du précipité obtenu par l'action de l'alcool-éther sur les sucres végétaux ou animaux, avec des solutions sucrées ne sont pas sans analogie avec le lait qui se laisse également envahir très rapidement par les ferments lactiques.

On voit donc que les résultats observés par M. Stoklasa et ses collaborateurs se vérifient avec la plus grande facilité; mais tels qu'ils les ont donnés ils sont incomplets, et surtout mal interprétés; les fermentations qui se déclarent dans les milieux qu'ils réalisent sont dues, d'après mes résultats, à des microbes et non à la zymase isolée des cellules végétales ou animales.

Mais je ferai remarquer ici une fois de plus qu'il ne résulte pas des faits qui précèdent, que les cellules animales et végétales ne renferment pas de zymase.

Elles produisent de l'alcool lorsqu'on les prive d'air; et l'on ne peut attribuer sa production qu'à la zymase.